

KNPV-werkgroep 'Phytophthora en Pythium'

Samenvattingen van de bijdragen, gehouden op de vergadering van 10 oktober 2002¹

Voorkómen van wortelziekten in gesloten grondloze groeisystemen door microbiële optimalisatie

J. Postma¹, en E.A. van Os²

¹ Plant Research International, Postbus 16, 6700 AA Wageningen

² Instituut voor Milieu- en Agrotechniek (IMAG), Postbus 43, 6700 AA Wageningen

Voor diverse kasgewassen is telen op substraat en hergebruik van de overtollige voedingsoplossing reeds meerdere jaren de gangbare praktijk in Nederland. In Zuid-Europese landen zoals Spanje en Italië zijn kasteelten nog merendeels grondgebonden. Hierbij worden tussen de opeenvolgende teelten, ter bestrijding van bodempathogenen, nog volop grondontsmettingsmiddelen zoals methylbromide gebruikt. Door de overgang van grond- naar substraatteelt, kan methylbromide verbannen worden. Andere voordelen van substraatteelt zijn betere stuurbaarheid van de teelt en hogere opbrengsten in kwantiteit en kwaliteit. Substraatteelt start in principe vrij van pathogenen, maar schimmels zoals *Pythium* en *Phytophthora* komen algemeen voor en kunnen zich na infectie met behulp van hun zoösporen zeer snel verspreiden door de voedingsoplossing in substraatteelten.

Het EU-project MIOPRODIS ('Microbial Optimisation to Prevent Root Diseases') had als doel de verspreiding en ziektedruk van pathogenen in substraatsystemen te onderzoeken in relatie tot de aanwezige microflora en verschillende ontsmettingsmethodieken van de hergebruikte voedingsoplossing. Als modelsystemen werden *Pythium aphanidermatum* in komkommer en *Phytophthora cryptogea* in tomaat en gerbera getoetst. Onderzoeksaspecten waren: (1) detectiemethode voor lage aantallen pathogenen; (2) karakterisatie van de microflora; (3) ontsmettingsme-

thodiek langzame zandfiltratie optimaliseren; (4) verspreiding en ziektedruk in kasproeven toetsen; en (5) effectiviteit van antagonisten of ziekteverdringende microflora nagaan.

Detectiemethoden voor *Pythium* en *Phytophthora* werden geoptimaliseerd. Zowel met nested-PCR als met een semi-specifieke uitplaatmethodiek was het mogelijk om zeer lage aantallen van het pathogeen in de voedingsoplossing te detecteren (nl. 10 propagels per liter). Voorafgaand aan de detectiemethoden werd 0,5 of 1 liter voedingsoplossing op een filter geconcentreerd. Ook real-time PCR (met Molecular Beacon) is toegepast voor het verkrijgen van (semi-)kwantitatieve data (methodiekontwikkeling door P. Bonants). Voor de detectie van *Pythium* en *Phytophthora* tijdens de verschillende kasproeven bleek de uitplaatmethodiek het beste te voldoen, omdat kwantitatieve data t.a.v. de geïnoculeerde pathogenen nodig waren. Voor de detectie van pathogenen in praktijksituaties, waarbij onbekend is met welke soorten pathogenen men van doen heeft, zijn de zeer specifieke moleculaire technieken zoals PCR onontbeerlijk (uitplaatmethodiek is slechts semi-selectief).

Pythium en *Phytophthora* bleken zeer effectief verwijderd te worden uit de gerecirculeerde voedingsoplossing door ontsmetting met zowel UV als langzame zandfiltratie. Beide ontsmettingsmethoden hadden geen invloed op de ziekteverdring door de microflora in het substraatsysteem. De omvang van de *Pythium* populatie in de niet ontsmette voedingsoplossing liep op tot vijftig à driehonderd kolonievormende eenheden per liter voedingsoplossing afhankelijk van het seizoen (resp. herfst en voorjaar). Dit ging gepaard met veertig (herfst) à tachtig (voorjaar) % planten met stengelbasisrot. Verwelking en groeireductie traden echter alleen op in combinatie met andere stressfactoren, zoals hoge kastemperatuur of ijzergebrek. Van de getoetste antagonisten gaf alleen een *Trichoderma* isolaat bij herhaalde toediening een duidelijke bescherming tegen *Phytophthora* in gerbera (ziekteductie van 37 naar 5 %).

Een demonstratie bij een tuinder te Almeria (Spanje) resulteerde in zeer positieve resultaten bij een tomaat-

¹ Door een samenloop van omstandigheden werd deze bijdrage over het hoofd zien gezien. Met excuses alsnog geplaatst.

tenteelt op substraat, waarbij de voedingsoplossing werd hergebruikt na ontsmetting door langzame zandfiltratie (gesloten systeem). In dit gesloten systeem was de opbrengst hoger en het aantal *Pythium* propagels lager dan in het systeem waarbij de voedingsoplossing niet werd gerecirculeerd (open systeem). Dit komt overeen met eerdere resultaten van M. McPherson (HRI, UK), waarbij een gesloten systeem ziekteverender was dan het vergelijkbare open systeem.

In november 2002 werd het MIOPRODIS project worden afgesloten met een symposium en een demonstratie in gerbera te Albenga (Italië).

Effect substraat op *Pythium* bij komkommer

Dirk Jan van der Gaag, Gerrit Wever en Chantal Bloemhard

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, sector Glastuinbouw, Naaldwijk

Pythium kan grote schade veroorzaken bij de teelt van komkommer. In de huidige praktijk is de schade gering omdat, veelal preventief, chemische middelen worden ingezet. Bij wegvallen of beperkte inzetbaarheid van deze middelen zal de teeltzekerheid van komkommer echter sterk afnemen als gevolg van een verhoogd risico op *Pythium*. Het ontwerpen van teeltsystemen met een laag risico op *Pythium* is daarom van groot belang. In onderzoek gefinancierd door het Productschap Tuinbouw is het effect bepaald van substraatsoort en -hoogte op *Pythium* bij komkommer.

In twee kasproeven is de ziekteverenderheid van de substraten steenwol, kokos, puimsteen en perliet met elkaar vergeleken. Hierbij werd de watergift aangepast aan substraatsoort en werd per substraat gekozen voor een substraathoogte die ook gangbaar is in de praktijk. In beide proeven bleek steenwol zeer receptief te zijn voor *Pythium* in vergelijking met de an-

dere drie substraten (Tabel 1). Zuurstofgehalten en substraattemperatuur konden de verschillen in ziekteverenderheid niet verklaren. Het vochtgehalte van de steenwolmatten was veel hoger dan dat van puimsteen en perliet en lijkt de verschillen in ziekteverenderheid tussen steenwol enerzijds en puimsteen en perliet anderzijds het beste te kunnen verklaren. Kokos is een organisch substraat met een hogere microbiële activiteit dan steenwol. *Pythium* zal zich hierdoor mogelijk veel minder snel kunnen ontwikkelen in kokos dan in steenwol.

In een andere proef (proef III) werd gekeken naar het effect van substraathoogte (7 en 14 cm) bij steenwol en perliet op aantasting van komkommer door *Pythium*. Op het lage steenwolsubstraat waren aan het eind van de proef 75% van de planten dood door *Pythium*. Op het hoge steenwolsubstraat en op perliet waren significant minder planten dood gegaan (0-17% dode planten).

De resultaten van de proeven geven aan dat: (I) het risico op schade door *Pythium* bij teelt op kokos, puimsteen of perliet veel lager is dan op steenwolmatten en (II) door verdubbeling van de substraathoogte bij steenwol het risico op *Pythium* sterk kan worden vermindert.

Genomics en *Phytophthora* - Een nieuwe aanpak voor een oud probleem

Wilco Ligterink en Francine Govers

Laboratorium voor Fytopathologie, Wageningen Universiteit

Het onderzoek in ons lab richt zich op de biologie en pathogenese van *Phytophthora infestans*. Wij zijn geïnteresseerd in het ontrafelen van de signaaltransductie wegen die betrokken zijn bij pathogenese en in het identificeren van *P. infestans* elicitors die afweerreacties oproepen in de plant.

Tabel 1. Effect substraat op *Pythium* bij komkommer

Substraat	Substraathoogte (cm)	Dode planten (%)	
		Proef I	Proef II
Steenwol	7 (standaard mat)	23,6 b ^x	50,0 b
Kokos	7 (standaard mat)	5,6 a	4,2 a
Puimsteen	18,5 (16,5 cm v.a. draingaat)	1,4 a	4,2 a
Perliet	18,5 (16,5 cm v.a. draingaat)	n.b. ^y	12,5 a ^x

^x Waarden gevolgd door dezelfde letter zijn niet significant verschillend volgens Fisher's protected LSD ($\alpha=0.05$)

^y n.b. = niet bepaald

Lange tijd hebben we in het moleculair-biologische onderzoek het 'one gene one PhD student' paradigma gehad, maar met de komst van nieuwe efficiënte technieken en methoden zijn we in staat om veel sneller een groot aantal genen te identificeren. In een internationaal samenwerkingsverband zijn databanken gegenereerd waarin zich DNA sequenties bevinden van een groot aantal *P. infestans* genen die tijdens verschillende ontwikkelingsstadia tot expressie komen, zogenaamde Expressed Sequence Tags (ESTs). Dit heeft gezorgd voor een explosieve groei in het aantal beschikbare *P. infestans* sequenties (van dertien in 1993 en 48 in 1998 naar meer dan 9000 unieke sequenties nu). Dit soort databanken zijn van groot belang, omdat ze inzicht verschaffen in bijvoorbeeld gendiversiteit, in differentiële genexpressie tijdens infectie en sporulatie en in metabole processen in *Phytophthora*. Zo bleek dat *P. infestans* beschikt over een uitgebreide elicetine genfamilie. Elicitines zijn extracellulaire eiwitten geproduceerd door verschillende *Phytophthora* en *Pythium* soorten die afweerreacties in planten kunnen activeren. Nader onderzoek toonde aan dat deze elicetine genen in clusters in het *P. infestans* genoom voorkomen en dat een zelfde clusterings te vinden is in *Phytophthora sojae*.

Maar er is meer nodig voor een verdere ontrafeling van *P. infestans* biologie en pathogenese. De afgelopen jaren zijn er verschillende DNA transformatie technieken ontwikkeld waarmee het mogelijk is om bepaalde genen met behulp van "gene-silencing" uit te schakelen. Hiermee is het mogelijk de functie van genen vast te stellen. Zo hebben we aangetoond dat signaaltransductie via heterotrimere G-eiwitten belangrijk is voor de pathogenese van *P. infestans*. Transformanten waarin een G α -eiwit gen gesilenced is zijn minder pathogeen.

Nieuwe meldingen van *Phytophthora*-waardplant combinaties en identificatie via sequentie-analyse

Martine Maes¹, Caroline Crepel¹,
Sven Inghelbrecht¹, Steve Baeyen¹ en
Svetoslav Bobev²

¹CLO-Departement Gewasbescherming, Merelbeke, België
(mail to: m.maes@clo.fgov.be)

²Higher Agricultural Institute, Department of Phytopathology, Plovdiv, Bulgarië (mailto:sbobev@au-plovdiv.bg)

In het Departement Gewasbescherming zijn zowel een diagnosecentrum voor planten als een onderzoekseenheid gehuisvest. Voor routine-analyse van

quarantaine schimmels wordt de moleculaire detectie via PCR geïmplementeerd in het diagnosecentrum. Zowel voor de quarantaine problematiek als voor andere stalen (monsters) kan het diagnosecentrum waar nodig terecht in de onderzoeksafdeling, waar de moleculaire technologie voor identificatie en detectie voorhanden is. Enkele opmerkelijke ziekten worden vermeld. Er werd een *Phytophthora* geïsoleerd uit bladvlekken op laurier. Dit symptoom was niet gekend. Het isolaat vertoonde atypische *in vitro* karakteristieken. De ITS I-sequentie van de stam had de hoogste homologie met *P. inflata*, een soort die zelden beschreven werd en sterk verwant is met *P. citricola*. Op *Prunus laurocerasus* werd voor de eerste maal aantasting door *P. cactorum* vastgesteld. Evenals *Peronospora sparsa* veroorzaakt dit pathogeen grote necrotische vlekken op het blad. *Phytophthora ramorum* is aanwezig in de Belgische bedrijven. Het aanbod van de diagnosestalen betrof tot hiertoe vooral Viburnum en in mindere mate Rhododendron. Er werd ook *P. ramorum* gedetecteerd in het drainwater van een rhododendron-cultuur en dit aan de hand van een loktest. De meer recente *Phytophthora* soorten en isolaten werden geïntegreerd in de DNA-array die ontwikkeld wordt voor diagnose van schimmelpathogenen op houtige gewassen. Hiertoe werd ook de ITS I-regio gesequeneerd van de Nederlandse variant van de elzen-*Phytophthora*. Zoals ook beschreven voor andere typen van elzen-*Phytophthora*, waren er twee verschillende ITS I-kopijen in deze stam aanwezig, wat duidde op zijn hybride karakter.

Doeltreffendheid van surfactants als bescherming van witloof tegen *Phytophthora cryptogea*

K.W.A. de Jonghe¹, A. Hoedekie² en M. Höfte¹

¹Universiteit Gent, Faculteit Landbouwkundige & Toegepaste Biologische Wetenschappen, Coupure Links 653, B-9000 Gent, België

²Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek, Departement Gewasbescherming, Burg. Van Gansberghelaan 96, 9820 Merelbeke, België

Phytophthora cryptogea veroorzaakt heel wat wortelproblemen bij de trek van witloof (*Cichorium intybus* var. *foliosum*) in hydrocultuur. Het pathogeen, een chromist, verspreidt zich in de pennen vanuit de worteltip die zich constant in hercirculerende voedingsoplossing bevindt. Reeds enkele jaren geleden werd het lyserend effect van surfactants op zoösporen aangetoond. Aangezien de zoösporen gevormd door *P. cryptogea* in de witlooftrek in hydrocultuur voor een

constante infectiedruk zorgen, werd in onderstaand onderzoek de *in vitro* en *in vivo* doeltreffendheid van enkele (bio)surfactants als bestrijding van het *Phytophthora*-wortelrot getest.

Bij de *in vitro* proeven werd de ontwikkeling van sporangia opgetekend volgens een scoresysteem (1, afwezig – 4, overvloedig) en werd het aantal overgebleven zoösporen geteld na behandeling met verschillende concentraties surfactant. Er werden 2 synthetische (G3780A^(*) en Atplus MBA1301^(*)) en 1 biosurfactant (PRO1^(**)) opgenomen in het experiment. Voor de synthetische surfactants was er al een significante remming van de sporangiënvorming vanaf 10 µg/ml, terwijl voor het biosurfactant de remming significant werd vanaf 50 µg/ml. Het effect op de overleving van de zoösporen was nog duidelijker: reeds vanaf 5µg/ml was er een significante remming te zien voor alle surfactants, terwijl voor beide synthetische surfactants bij 20µg/ml en voor het biosurfactant PRO1 bij een concentratie van 50 µg/ml geen zoösporen meer teruggevonden werden.

De *in vivo* proeven werden in twee stappen uitgevoerd. In een eerste fase werden de surfactants getest op geïnfecteerde wortels, geplaatst in kleine potten met 500ml (stilstaande) voedingsoplossing. De infectie werd uitgevoerd met een myceliumoplossing (1ml myceliumoplossing/500ml voedingsoplossing = 0,05g DS mycelium/pot) en voor de beoordeling, na veertien dagen, werd een scoresysteem voor de zijwortelgroei opgesteld en werd de uitgroei van het pathogeen in de wortel opgemeten. In een tweede fase werden de surfactants in een mini hydrocultuursysteem getest. De opstelling bestond uit drie niveau's witloofwortelen in een gesloten systeem met tachtig liter circulerende voedingsoplossing. Voor het synthetisch surfactant Atplus MBA1301 werd bij een toegepaste concentratie van 20 µg/ml een volledige controle van de ziekte verkregen, onafhankelijk van het tijdstip van bijsnijden van de witloofpennen (vlak voor, 48u, of 96u voor infectie). Dit bleek ook uit de zijwortelontwikkeling (van weelderig bij de gezonde pennen tot afwezig bij ernstige aantasting). In de hydrocultuur werd bij dezelfde concentratie Atplus MBA1301 opnieuw een belangrijke ziektebeheersing vastgesteld na vertien dagen, maar niet zo volledig als in de potproeven. Na 21 dagen waren reeds een groot deel van de verschillen tenietgedaan. Dit toont aan dat een (wekelijkse) herbehandeling noodzakelijk lijkt te zijn om het effect van de surfactants te onderhouden. Voor PRO1 werden overeenkomstige, doch iets minder extreme resultaten bekomen voor 50 en 100 µg/ml. Het effect op een toepassing van 100 µg/ml PRO1 op een zoösporeninfectie was nog meer in het oog springend, daar een groot deel van de zoösporen reeds binnen de minuut na de toepassing geïsoleerd waren.

Zowel synthetische surfactants zoals Atplus MBA 1301 als biosurfactants zoals PRO1 bieden een uitstekend alternatief voor het verminderen van het aantal toegepaste fungiciden tegen *Phytophthora cryptogea* in de witlooftek in hydrocultuur. Niet alleen zou de hoeveelheid actieve stof van de toegepaste bestrijdingsmiddelen drastisch kunnen verminderd worden, de (bio)surfactants op zichzelf zouden toegepast kunnen worden als bestrijding van het wortelrot.

(*) Ter beschikking gesteld door UNIQEMA

(**) Ter beschikking gesteld door PLANTSUPPORT (NI)

Multiplexdetectie *Phytophthora* sp. met behulp van PamGene micro-arrays

Peter Bonants, José van Beckhoven, Marjanne de Weerd en Cor Schoen

Plant Research International bv, Postbus 16, 6700 AA Wageningen (peter.bonants@wur.nl)

Micro-arrays worden meer en meer ingezet voor complexe analyses van DNA monsters. PamGene bv heeft een nieuw soort driedimensionale micro-array ontwikkeld waarin hybridisaties real-time gevolgd kunnen worden. Een additionele optie is dat de temperatuur kan worden veranderd, waardoor specifieke hybridisatiecondities kunnen worden gecreëerd. De traditionele tweedimensionale micro-arrays hebben deze voordelen niet. Dit 3D-systeem wordt momenteel uitgetest voor multiplex detectie van *Phytophthora* spp.

Phytophthora bestaat uit een groot aantal soorten. In de literatuur zijn inmiddels meer dan vijftig verschillende soorten beschreven en dit aantal breidt zich nog steeds uit. Vele soorten zijn pathogeen voor meerdere gewassen. Ook kunnen op diverse gewassen meerdere *Phytophthora* soorten voorkomen. Van meer dan 200 *Phytophthora*-isolaten van diverse soorten zijn de ITS-1 en ITS-2 sequenties van het ribosomaal DNA bepaald. Similariteitsdendrogrammen laten zien dat soorten binnen *Phytophthora* goed van elkaar kunnen worden onderscheiden op basis van deze ITS sequenties. Deze worden dan ook veelvuldig gebruikt om specifieke PCR detectiemethodes voor een bepaalde *Phytophthora* soort te ontwikkelen. Op basis van de verschillen in ITS sequenties zijn nu soortspecifieke probes ontwikkeld die gespot worden op de 3D micro-array. De eerste resultaten m.b.t. multiplex detectie voor diverse *Phytophthora* soorten m.b.v. deze micro-array zijn veelbelovend.