

den onderzocht op het IRS. De ontwikkeling van een moleculaire methode werd tijdens de werkgroepbijeenkomst besproken. Allereerst werden RAPD patronen gemaakt van representatieve isolaten. Een uniek fragment voor AG 2-2 isolaten werd vervolgens geklooneerd en gesequenced. Op basis van dit fragment werden primersets ontwikkeld en getoetst op een collectie van alle anastosegroepen van *R. solani*, enkele andere schimmels, bacteriën en suikerbiet. De gemaakte fragmenten bleken specifiek voor AG 2-2IIIB en AG 2-2IV isolaten. De primersets werden vervolgens getoetst op DNA-monsters die verkregen waren uit wel/of niet geïnfecteerde planten en gronden, die al dan niet besmet waren met een AG 2-2IIIB isolaat. De ontwikkelde AG 2-2IIIB primersets zijn in principe geschikt om AG 2-2IIIB in plant en grond te detecteren.

Phytophthora en Pythium ***Bijeenkomst van 18 september 2003***

De laatste ontwikkelingen in de bestrijding van Phytophthora in aardappelen

H.T.A.M. Schepers

PPO-Akkerbouw, Groene ruimte en Vollegrondsgroenten

De bestrijding van *Phytophthora infestans* in aardappel is het grootste probleem in de akkerbouw. Door de sterk toegenomen genetische variatie is het aanpassingsvermogen van *P. infestans* verder vergroot. Het primaire inoculum dat voorheen met name kwam van afvalhopen komt nu ook van latent aangestast pootgoed en oösporen. Er is de laatste jaren een trend naar het steeds vroeger optreden van de eerste aantastingen waardoor ook de bestrijding met fungiciden intensiever wordt. Andere factoren die de bestrijding bemoeilijken zijn ook de bredere waardplantenreeks van *P. infestans* en het niet (continu) beschikbaar zijn van een breed arsenaal aan fungiciden. Om te komen tot een duurzame beheersing en een reductie van de milieubelasting met 75% heeft het ministerie van LNV recentelijk extra financiële middelen beschikbaar gesteld om naast het lopende onderzoek aanvullend onderzoek uit te voeren. Het onderzoek wordt door WUR uitgevoerd. Om te zorgen voor een goede aansluiting bij de praktijk is het bedrijfsleven intensief betrokken bij de opzet van het onderzoek. Het aanvullende onderzoek is verdeeld in 6 thema's: (1) Genomics *P. infestans*, (2) Genomics interactie aardappel en *P. infestans*, (3) Nieuwe bronnen van resistentie, (4) Epidemiologie, (5) Populatiegenetica en (6) Toolbox waarin alle resultaten worden geïntegreerd en beproefd op hun waarde voor de

praktijk. Jaarlijks worden alle nieuwe resultaten samengevoegd tot een beheersingsstrategie van *P. infestans* die onder praktijkomstandigheden zorgt voor een goede bestrijding van phytophthora tezamen met een goed bedrijfseconomisch resultaat en een lage milieubelasting. De beheersingsstrategie wordt door het Masterplan Phytophthora gebruikt in de communicatie naar de praktijk.

Onderzoek Phytophthora ramorum

Hans de Gruyter¹ en Peter Bonants²

¹Plantenziektenkundige Dienst, Wageningen

²Plant Research International, Wageningen

Binnen de EU is het uitvoeren van onderzoek naar de aanwezigheid van *Phytophthora ramorum* in de lidstaten onderdeel van EU noodmaatregelen, gericht op het voorkomen van introductie bij import, en de verspreiding van de schimmel. In 2002/2003 werden survey's uitgevoerd in de groene ruimte en de boomkwekerij. In de groene ruimte werden door de PD verspreid over Nederland 1400 locaties met *Rhododendron* geïnspecteerd, waarbij op 2% van de locaties een besmetting werd geconstateerd. In de verdiepende survey werden op deze besmette locaties ook andere potentiële waardplanten als eik en beuk onderzocht, er werden echter geen besmettingen gevonden. Tevens werden ook 100 locaties met *Vaccinium myrtillus* geïnspecteerd, een potentiële waardplant welke in infectieproeven erg vatbaar bleek, er werden geen aantastingen gevonden. In de boomkwekerij werden 1080 bedrijven geïnspecteerd door de NAKt waarbij in 2002 op 3,8% van de bedrijven een aantasting door *P. ramorum* werd gevonden. Het ging hierbij voornamelijk om aantastingen bij *Viburnum* (x) *bodnantense* 'Dawn' en in mindere mate *Rhododendron*. In 2003 bleek het aantal besmette bedrijven afgenomen tot minder dan 1%. De resultaten van de survey's worden in december besproken in het Permanent Fyosanitair Comité, waarna besloten wordt over aanpassing en verlenging van de maatregelen. Door de PD wordt een onderzoek uitgevoerd op een locatie met zwaar aangetaste *Rhododendron* struiken, waarbij gekeken wordt naar de effectiviteit van maatregelen ter bestrijding van de ziekte. Aangetaste struiken werden op ca 40 cm hoogte afgezaagd, waarbij het effect van diverse stobbebehandelingen (stobbedodend middel, fungicidenbehandeling, onbehandeld) wordt onderzocht op uitgroei en eventuele herbesmetting. Daarnaast wordt gekeken naar het effect van wel of niet afvoeren van het versnipperd materiaal, en worden in de objecten periodiek grondmonsters genomen voor onderzoek op aanwezigheid van de schimmel. Eerste resultaten laten zien dat vanuit de stobben gemakkelijk nieuwe scheuten worden gevormd, waar

echter na korte tijd aantastingen werden gevonden. Deze besmetting vindt niet vanuit de omgeving plaats, maar vanuit diepergaande aantastingen in de stobben. Op locaties met een zware aantasting blijkt de ziekte zich verder verspreid te hebben dan in eerste instantie is waar te nemen. Ook blijken individuele struiken zwaarder aangetast te zijn dan de symptomen laten zien. In de grond kan de schimmel tot op heden slechts incidenteel worden aangetoond, en is er geen verschil gevonden tussen wel of niet afvoeren van het versnipperde materiaal.

Voor de diagnostiek van ingezonden monsters op *P. ramorum* waren bij aanvang van deze survey twee methoden beschikbaar, nl. het isoleren en uitkweken op voedingsmedia, en een ITS-PCR.

Door zowel de PD als het PRI is onderzoek verricht naar toepassingsmogelijkheden van nieuwe moleculaire technieken. Dit heeft op de PD geresulteerd in de implementatie en validatie van een real-time ITS-PCR, welke is ontwikkeld in Californië. Ingezonden monsters worden eerst onderzocht met real-time PCR, bij een positieve uitslag wordt vooralsnog een kweek ingezet ter bevestiging, momenteel wordt in EPPO en EU verband besproken of in plaats van kweek een tweede moleculaire techniek geaccepteerd kan worden.

Door PRI is in samenwerking met de PD met behulp van moleculaire technieken gekeken naar een groot aantal isolaten van *Phytophthora ramorum* afkomstig uit diverse landen in Europa maar ook vanuit de VS. De VS lijst is samengesteld door Kelly Ivors (Univ. California, Berkeley), waarmee intensief wordt samengewerkt. De gebruikte technieken zijn ITS sequentie analyse, AFLP, Gen sequentie analyse en PCR-RFLP. De ITS sequenties zijn gelijk voor de diverse isolaten uit zowel de EU als de VS. De *P. ramorum* ITS sequentie was duidelijk verschillend van andere *Phytophthora* soorten en nauw verwant aan die van *P. lateralis*. AFLP DNA fingerprint patronen geven minimale verschillen. Wel is duidelijk dat bij dit grote aantal isolaten twee groepen zijn te onderscheiden: een Europese en een Amerikaanse groep. Herkenning van beide groepen is erg belangrijk omdat bij deze heterothallische *Phytophthora* soort de Europese populatie tot nu toe bijna altijd A1 type blijkt te zijn en de Amerikaanse populatie altijd A2. De maatregelen in internationaal verband zijn er mede op gericht om introductie van het complementaire type tegen te gaan. Er werden een viertal genen gesequenced: nadh dehydrogenase, cox1, b-tubuline en translatie elongatie factor 1a. De sequentie van het Cox 1 gen vertoonde één puntmutatie verschil tussen Europese en Amerikaanse isolaten. De overige genen gaven geen verschil te zien. De VS isolaten hebben een extra restrictie site, wat resulteert in een verschillend digestiepatroon.

Op basis van dit sequentie verschil kon een PCR-RFLP test ontwikkeld worden om de Amerikaanse en

Europese groep van elkaar te kunnen onderscheiden. De ontwikkelde PCR-RFLP test wordt gevalideerd op de totale set van meer dan 200 isolaten en wordt verder ontwikkeld voor gebruik in planta. Hiervoor zullen DNA monsters van PRI en van de PD worden gebruikt die verkregen zijn van (al dan niet artificieel) besmette planten.

Het genoom van *P. ramorum* wordt momenteel gesequenced. De sequentie zal binnen twee tot drie maanden beschikbaar komen. Primers zullen ontwikkeld worden om SSR (microsatellites) te amplificeren. Veel isolaten zullen getest worden voor polymorfisme. Ontwikkelde microsatellite markers zullen worden getest in vitro en in planta om een isolaat direct te kunnen genotypen. Een multiplex test zal worden ontwikkeld om meerdere loci tegelijk te screenen.

Hybridisatie en soortsvorming in *Phytophthora*

L.P.N.M. Kroon, N.E. Adler en W.G. Flier

Plant Research International, Postbus 16,
6700 AA Wageningen Laurens.Kroon@wur.nl

Hybridisaties tussen verschillende *Phytophthora* soorten hebben recent meermaals plaatsgevonden. Enkele voorbeelden zijn de aantasting van elzen door een *Phytophthora* hybride in West Europa, en de vorming van *P. nicotianae* x *P. cactorum* hybriden in hydrocultuur in Nederland. Onderzoek in *Phytophthora* populaties in Ecuador heeft aanwijzingen opgeleverd voor een hybridisatie gebeurtenis tussen *P. infestans* en een nog onbekende *Phytophthora* soort in deze regio.

In Ecuador komt een groot aantal nachtschade-achtige plantensoorten voor (Solanaceae). Verschillende soorten worden ieder aangetast door een aantal gespecialiseerde populaties van *Phytophthora*. Zeker vier afzonderlijke populaties kunnen worden gekarakteriseerd op basis van mating type, mitochondriële (haplo)type, DNA fingerprints, isozym patronen en waardplant specificiteit. Deze populaties verschilden wezenlijk van de reeds bekende *P. infestans* populaties in dit gebied. Toch leek een deel van de gevonden DNA merkers, haplotypen en isozym patronen afkomstig uit *P. infestans*, een indicatie dat de nieuwe populaties ontstaan zijn uit een kruising tussen *P. infestans* en een ander, nog onbekende *Phytophthora* soort. DNA sequentie-analyse heeft aangetoond dat het nieuw gevonden mitochondriële type in één van de vier nieuwe populaties veel lijkt op het mitochondriële DNA van *P. infestans* en nauw verwante soorten (*P. mirabilis*, *P. phaseoli*, *P. ipomoeae*), maar toch uniek is. De vermeende kruisingspartner van *P. infestans* valt dus waarschijnlijk binnen dezelfde groep als deze soorten.

Hybridisatie gebeurtenissen kunnen verstrekkende gevolgen hebben: er kunnen nieuwe combinaties ontstaan van pathogeniteits-factoren en cultuureigenschappen in de nakomelingen. De hybride nakomelingen kunnen bijvoorbeeld het vermogen hebben om geheel nieuwe plantensoorten aan te maken, en zo uiteindelijk een nieuw soort te vormen. DNA sequentie-analyse van een groot aantal *Phytophthora* soorten toont aan dat in de loop van de evolutie een aantal hybridisaties hebben plaatsgevonden, zelfs tussen soorten die evolutionair ver van elkaar af stonden. De invloed van hybridisatie op soortsvorming binnen *Phytophthora* kan dus groot zijn.

Ethyleen-ongevoeligheid bij planten verhoogt de vatbaarheid voor *Pythium* spp.

Bart Geraats

Botanische oecologie en evolutiebiologie, Universiteit Utrecht

Huidig adres: Nunhems Zaden B.V., Nunhem

Transgene 'Tetr' tabaksplanten zijn ongevoelig voor het plantenhormoon ethyleen en blijken een verhoogde vatbaarheid te hebben voor wortelinfectie door verschillende van nature in de bodem voorkomende schimmels (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizopus stolonifer*, en *Thielaviopsis basicola*) en -schimmelachtigen (*Pythium* spp.).

Uit experimenten bleek dat Tetr planten ook gevoeliger waren voor pythium wanneer deze direct in de stengel werd geïnoculeerd. Bovendien werd aangetoond dat bij door pythium aangetaste tabaksplanten met een gelijke ernst van ziektesymptomen, de stengels van Tetr planten meer pythium bevatten dan die van niet-transgene planten. Blijkbaar zijn Tetr planten niet alleen gevoeliger voor verwelking en stengelbasisrot veroorzaakt door pythium, maar laten ze ook verhoogde stengelkolonisatie door deze ziekteverwekker toe.

Er werd onderzocht of de resistentie tegen pythium in Tetr planten hersteld kon worden door een behandeling met bepaalde chemicaliën die resistentie kunnen induceren, door behandeling met antagonistische bacteriën die op plantenwortels kunnen groeien, of door planten te transformeren met bepaalde ziekteafweer gerelateerde genen. Geen van deze behandelingen beschermde de ethyleenongevoelige planten echter tegen pythium. Deze resultaten laten zien dat het heel moeilijk is om de verhoogde vatbaarheid van ethyleenongevoelige, Tetr tabaksplanten te reduceren. Vergelijkbare resultaten werden verkregen in de modelplant zandraket (*Arabidopsis thaliana*). Blijkbaar speelt ethyleen in planten een centrale rol bij ziekteresistentie tegen pythium.

***Phytophthora ramorum* in België: resultaten van de opsporingsactie 2002 en onderzoeksresultaten**

K. Heungens, C. Crepel, S. Inghelbrecht en M. Maes

Centrum Landbouwkundig Onderzoek (CLO) – Departement Gewasbescherming (DGB), Burg. Van Gansberghelaan 96 / 9820 Merelbeke / Belgium

Phytophthora ramorum is een nieuwe *Phytophthora* soort die in Europa voorkomt op *Viburnum* en *Rhododendron* planten. Deze soort veroorzaakt blad- en twijgnecrose en afsterven van de planten. In Europa blijven de problemen tot dusver vooral beperkt tot *Rhododendron*- and *Viburnum*-planten uit de kwekerijen, maar in de VS is een variant van deze schimmel verantwoordelijk voor "Sudden Oak Death" (SOD) in Californië en Oregon. Hij werd daar ook reeds geïsoleerd uit twintig verschillende waardplantsoorten.

De recente detectie van *P. ramorum* in kwekerijen in verschillende Europese landen en de onwetendheid over de bedreiging voor Europese boomsoorten heeft geleid tot de implementatie van fytosanitaire maatregelen. Als antwoord hierop zijn er in verschillende landen opsporingsacties georganiseerd en werd er onderzoek gestart ter ondersteuning van de nodige risico-analyse. De resultaten van de opsporingsactie die in 2002 doorging in de Belgische bedrijven worden voorgesteld. *P. ramorum* is aanwezig in België en de besmettingsgraad is te vergelijken met die in de omliggende landen. De pathogeen blijkt random verspreid te zijn over de bedrijven. Het CLO heeft verder onderzoek verricht over het *in vitro*-effect van oömyceten-fungiciden op *P. ramorum*, over de gevoeligheid van verschillende *Rhododendron* cultivars, over het binnendringen van de pathogeen in onder- en bovenkant van het blad en over de condities voor overleving in het blad. Sommige fungiciden hebben sterke *in vitro*-activiteit tegenover *P. ramorum* en moeten verder op de plant getest worden. Er is weinig verschil in de ziektegevoeligheid van de geteste *Rhododendron* cultivars. Dit kan duiden op de beperkte mogelijkheid van een waardplantresistentie als beheersstrategie. De infectietesten tonen ook aan dat de onderkant van het blad en de bladwonden het meest gevoelig zijn voor infectie. Na binnendringen in het blad, kan de pathogeen goed overleven, ook in afgeknipte bladeren die koel en vochtig bewaard worden. De bekomen onderzoeksgegevens kunnen bijdragen tot beheersmaatregelen voor *P. ramorum* op bedrijfsniveau en ter ondersteuning van het beleid ter zake.

Biologische bestrijding van *Pythium aphanidermatum* in substraatteelt

Joeke Postma

Plant Research International, Postbus 16, 6700 AA Wageningen

Pythium aphanidermatum is een moeilijk te beheersen wortelpathogeen in komkommer geteeld op substraat. Resistente rassen zijn niet beschikbaar en bestaande biologische bestrijdingsmiddelen zijn onvoldoende effectief. Dit laatste bleek uit een uitgebreide inventarisatie van gewasbeschermende stoffen en micro-organismen van natuurlijke oorsprong (GNO's) door PPO-glastuinbouw. Resultaten van deze inventarisatie zijn te vinden op www.gewasbescherming.nl.

Onderzoek van de afgelopen jaren heeft aangetoond dat gebruikte steenwolmatten wel significant en herhaalbaar ziekteonderdrukkend zijn, indien in de voorafgaande teelt geen ernstige *Pythium*-aantasting optrad. In verband met risico's ten aanzien van andere ziekten en plagen, is de toepassing van gebruikte matten helaas geen geschikte optie voor de praktijk. Er is daarom in deze ziekteverende substraten gezocht naar nieuwe effectieve antagonisten. Twee bacterie-isolaten bleken in kortdurende bio-toetsen perspectiefvol: *Lysobacter enzymogenes* (Folman *et al.*, 2003. Microbiol. Res. 158:107-115) en *Streptomyces griseus*. In toetsen met komkommerplanten geteeld in een eb- en vloedsysteem gedurende 5 weken gaven beide isolaten echter toch weer tegenvallende resultaten, behalve als de isolaten gecombineerd werden met een koolstofbron. Vervolgonderzoek richt zich op de optimalisatie van de toediening van deze antagonisten in combinatie met deze koolstofbron.

Phytophthora infestans

Integratie Masterplan & Parapluplan Phytophthora (2003 – 2013)

Piet M. Boonekamp

Plant Research International, Postbus 16, 6700 AA Wageningen. E-mail: p.m.boonekamp@wur.nl

De aardappelziekte, veroorzaakt door de oömyceet *Phytophthora infestans*, wordt gezien als de ernstigste bedreiging voor de continuïteit van de Nederlandse aardappelteelt (180.000 ha), vanwege een grootschalige inzet van fungiciden. Het Masterplan Phytophthora, een sectorinitiatief, is vanaf 1999 met succes bezig om via de financiering van toepassingsgerichte onderzoeksprojecten en brede verspreiding van bestaande en nieuwe kennis de milieubelasting veroorzaakt door de phytophthorabestrijding te verminderen.

Omdat de *Phytophthora infestans* populatie agressiever is, in staat is een aanzienlijk aantal resistentiegenen te doorbreken en er geen resistente rassen voorhanden zijn die tevens aan de gestelde kwaliteitseisen voldoen, is een extra onderzoekinspanning nodig om tot een duurzame beheersing van de aardappelziekte te komen. Een uniek onderzoekspotentieel zowel wat betreft organisatie als multidisciplinaire inhoud is ontstaan door een concentratie van al het Wageningen UR Phytophthora onderzoek in het Parapluplan Phytophthora. Integratie van het Masterplan Phytophthora en het Parapluplan Phytophthora moet tot een duurzame beheersing van de aardappelziekte leiden.

Dit artikel is een verkorte weergave van de presentaties van de KNPV werkgroep *Phytophthora infestans* op de KNPV najaarsvergadering 2003.

ONTSTAANSGESCHIEDENIS

Het Masterplan Phytophthora is als sectorinitiatief in 1999 gestart met het doel om door verspreiding van bestaande kennis en financiering van praktijkonderzoek tot een halvering van de milieubelasting ten behoeve van phytophthorabestrijding te komen (in 2005). Het Masterplan Phytophthora had oorspronkelijk een looptijd van 1999 tot en met 2003, maar is verlengd. Het plan wordt gefinancierd door akkerbouwers via een extra heffing per hectare. Iedere teler wordt door voorlichting bereikt (ook volkstuinders). De Beslissingen Ondersteunende Systemen (BOS'en) en telefonische waarschuwingssystemen blijken goed te werken. Een monitoringsysteem wordt gebruikt om resultaten te monitoren en de doelstellingen te evalueren. Daarnaast verzorgt het Masterplan de handhaving van de Phytophthoraverordening. Voor de langere termijn wordt ook het gebruik van resistente rassen ondersteund. De sector laat door middel van het Masterplan zien zeer goed in staat te zijn om kennis te communiceren, te implementeren en regelgeving te handhaven, zodat daadwerkelijk een reductie van middelen gerealiseerd wordt.

Het Parapluplan Phytophthora is een consortium van al het Wageningen UR onderzoek aan phytophthora in aardappel, dat bij Wageningen Universiteit, Plant Research International en Praktijkonderzoek Plant en Omgeving wordt uitgevoerd. Eerst werd geïnventariseerd welk onderzoek bij de Wageningen UR partijen al liep. (zie fig 1, sector LNV en onderzoek). Eind 2001 werd op basis van deze inventarisatie in een Workshop met alle sectorpartijen vastgesteld dat er op een aantal gebieden nog een lacune aan kennis was. Geconcludeerd werd dat hiervoor een tienjarig onderzoeksprogramma nodig zou zijn, het zogenaamde Parapluplan Phytophthora, met voor de komende vijf jaar een benodigd budget van ca. twintig m€. Er ontbrak op dat moment nog veertien m€ om het Parapluplan gestalte te kunnen geven. Twee initiatieven maakten de uitvoering van het Parapluplan mogelijk.