

## Microsatelieten *Phytophthora ramorum*

Peter Bonants<sup>1</sup>, Ineke de Vries<sup>1</sup>, Els Verstappen<sup>1</sup>, Matteo Garbelotto<sup>2</sup> en Kelly Ivors<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Plant Research International, Wageningen, The Netherlands,

<sup>2</sup>Dept. of ESPM-ES, University of California, Berkeley, CA, USA, <sup>3</sup> Dept. of Plant Pathology, North Carolina State University, Fletcher, NC, USA.

Zoals bekend zijn er diverse isolaten van *Phytophthora ramorum* gevonden op diverse gewassen in Europa en de VS. In Nederland en diverse landen van Europa voornamelijk in kwekerijen op *Rhododendron* en *Viburnum*. Recent is voor het eerst ook in Nederland een aantasting in *Taxus* aangetoond. Belangrijker is de recente vondst van de PD in een Amerikaanse eik (*Quercus rubra*) in openbaar groen in de omgeving van Nijmegen. Het gaat hier om een eerste vondst van *P. ramorum* in een boom in Europa. Ongeveer tegelijkertijd werd in Engeland eveneens *P. ramorum* aangetroffen in een andere uitheemse eikensoort (*Quercus falcata*). In dergelijke gevallen is het van belang om vast te stellen of het een nieuw of oud genotype betreft en waar de besmetting vandaan komt. Voor tracersing van het betrokken isolaat is het noodzakelijk om te beschikken over een geschikte genotyperingsmethode (een methode om m.b.v. streepjescodes van het DNA een isolaat te karakteriseren). De momenteel beschikbare methodes gaan allen uit van reïncultures, gevolgd door opkweek en DNA isolatie. Echter, in vele gevallen kan geen reïncultuur worden verkregen maar dient toch bepaald te worden of er een ander genotype in het spel is. De PD heeft derhalve een fytosanitair belang om een goede genotyperingsmethode in handen te hebben. Dit project beoogt derhalve een dergelijke methode te ontwikkelen die in planta gebruikt kan worden door de PD. Een bijkomend voordeel van deze methode is dat de methode ook ingezet kan worden om seksuele kruisin-

gen te bestuderen. Tot voor kort werd alleen het A1 mating type gevonden in de EU en A2 in de VS. Echter, een enkel isolaat van het A2 mating type is nu gevonden in België en het A1 mating type in een kwekerij in de VS. Seksuele sporen zijn nog niet gevonden. Het voorkomen van beide mating types in dezelfde regio kan potentieel leiden tot een seksueel reproducerende populatie en kan een nieuwe bron van inoculum genereren.

### Methode:

Hierin wordt gebruik gemaakt van microsatelieten. Microsatelieten zijn korte repeterende sequenties van 2 of 3 basen, zgn repeats. Variatie zit meestal in het aantal repeats dat in een isolaat aanwezig is. Microsateliet variatie kan gebruikt worden om isolaten zo een unieke streepjescode te geven. Deze methode is dan uitermate geschikt om isolaten te traceren, hybridisatie te bestuderen, verschillen tussen populaties aan te tonen en om de mate van gene flow te bepalen tussen en binnen populaties en wordt bv. ook gebruikt om mensen te genotyperen in o.a. forensische studies. De genomesequentie van *P. ramorum* is recentelijk bepaald door het Joint Genome Institute in de VS en onlangs is binnen Plant Research International een software-tool ontwikkeld die efficiënte identificatie van microsatelieten en design van primers voor de PCR amplificatie van deze microsatelieten mogelijk maakt. Het computerprogramma wordt nu gebruikt om in de genomesequentiedata van *P. ramorum* microsatelieten op te sporen en een genotyperingsmethode te ontwikkelen. Momenteel zijn 1334 microsatelieten met primercombinaties geselecteerd. Hiervan zijn er 102 uitgetest. Eerste resultaten laten zien dat er 14 bruikbaar zijn voor een grootschalige screening om te onderzoeken of en hoe groot de variatie is tussen honderden isolaten vanuit de EU en de VS. Van meer dan 200 isolaten is momenteel DNA en/of gevriesdroogd mycelium voor dit project beschikbaar, afkomstig van diverse landen binnen de EU als ook uit de VS, maar ook van diverse waardplanten.