

sequenties kunnen we 'gedegenereerde PCR' gebruiken om de corresponderende DNA sequenties te identificeren.

## Ontwikkeling en implementatie van een moleculaire toets voor in planta detectie van *Fusarium foetens*

Linda Kox<sup>1</sup>, Ilse Heurneman<sup>1</sup>,  
Marjanne de Weerd<sup>2</sup>,  
Gerard van Leeuwen<sup>1</sup>,  
Carolien Zijlstra<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Plantenziektenkundige Dienst,  
Postbus 9102, 6700 HC Wageningen

<sup>2</sup>Plant Research International,  
Postbus 16, 6700 AA Wageningen

*Fusarium foetens* is een nieuw pathogeen voor *Begonia elatior* planten. Deze schimmel is op grond van morfologie lastig te onderscheiden van *Fusarium* species die deel uitmaken van het zeer verwante *F. oxysporum* species complex (FOC). Met behulp van RAPD-fingerprinting (Schroers *et al.*, Mycologia 2004, 96: 393-406) is het mogelijk om *F. foetens* te onderscheiden van FOC. Nadeel van de methode is dat een reïncultuur van de schimmel nodig is, hetgeen een tot twee weken in beslag neemt. Wij hebben twee specifieke moleculaire toetsen ontwikkeld voor de directe detectie van *F. foetens in planta*: (1) een real-time (Taqman) PCR methode gebaseerd op mitochondriële small subunit (mtSSU) rDNA sequenties en (2) een conventionele PCR met het elongatiefactor (EF) -1 alpha gen als target. De specificiteit van beide methoden werd bepaald met zestien isolaten van *F. foetens*, 28 isolaten van FOC species, een isolaat van *F. begoniae* en 1 isolaat van *F.*

*commune*. Alle *F. foetens* isolaten werden aangetoond. Er werd geen kruisreactie gevonden met de andere *Fusarium* species. Beide methoden gaven positieve resultaten met blad, stengel en basis van geïnfecteerde *Begonia* planten. Sinds december 2004 wordt de Taqman PCR op de PD ingezet voor routinematige toetsing op de aanwezigheid van *F. foetens in planta*. Tot nu toe zijn er 21 monsters getoetst met de Taqman PCR. Vier monster bleken positief in de Taqman PCR. Deze vier monsters waren ook de enige waaruit *F. foetens* kon worden geïsoleerd middels kweek. RAPD analyse op de reïncultures bevestigde de aanwezigheid van *F. foetens* in het plantmateriaal. Onze conclusie is dat de Taqman PCR een snelle en betrouwbare methode is voor het direct aantonen van *F. foetens* in *Begonia*.

## Cytogenetica van *Fusarium* soorten

Cees Waalwijk, Masatoki Taga  
en Gert Kema.

Plant Research International,  
Droevendaalsesteeg 1,  
6708 PB Wageningen

Chromosomen van schimmels zijn zo klein dat klassieke cytologie, zoals die wordt gebruikt bij planten en dieren niet mogelijk is. Met behulp van de Germ Tube Burst Method (GTMB) is dit inmiddels wel mogelijk. De kiembuizen van net ontkiemde sporen van verschillende schimmelsoorten worden hierbij opgeblazen, waarna de specimen met een DNA kleuring worden zichtbaar gemaakt. Deze methode is toegepast op verschillende soorten uit het geslacht *Fusarium*. In *Fusarium graminearum* zijn vier chromosomen geïdentifi-

ceerd, een aantal dat overeenkomt met het aantal koppelingsgroepen in de genetische kaart en het aantal fragmenten van de fysische kaart (<http://www.broad.mit.edu/annotation/funqi/fusarium/maps.html>). Dit aantal is het kleinste dat tot op heden is gevonden in filamenteuze schimmels. Verwante soorten zoals *F. pseudograminearum* en *F. culmorum* hebben eveneens vier chromosomen. Daarentegen bestaat het genoom van minder verwante soorten, zoals *F. oxysporum*, pathogeen van meer dan honderd verschillende plantensoorten, en *F. verticillioïdes* en *F. proliferatum*, berucht om hun vermogen tot de productie van het mycotoxine fumonisine, steeds uit twaalf chromosomen. Dit aantal komt overeen met de waarnemingen voor deze soorten mbv Pulsed Field Gel Electrophoresis en de genetische kaart van *F. verticillioïdes*.

## Samenvattingen werkgroep *Phytophthora* & *Pythium*

Bijeenkomst van 23 september  
2004 te Merelbeke (B)

## Monitoring van *Pythium* en *Phytophthora* in de glastuinbouw

Adriaan Vermunt

Groen Agro Control, Delfgauw

Groen Agro Control (GAC) is een servicelaboratorium en adviesbureau voor de agrarische sector. Voor de diagnose van plantenziekten maakt GAC onder andere gebruik van micro-

scopie, uitplaatmethoden en DNA-analyses. Alleen visuele beoordeling van symptomen brengt het risico met zich mee dat een verkeerde diagnose gesteld wordt. Een voorbeeld hiervan is verwelking en vaatverbruining bij tomatenplanten. Vaak wordt hiervan gedacht dat dit veroorzaakt wordt door *Verticillium*. Uit analyses blijkt dat deze symptomen ook veroorzaakt kunnen worden door de combinatie van *Pythium* en pepinomozaïekvirus. Voor het treffen van de juiste maatregelen is het belangrijk om de juiste diagnose te stellen. Met behulp van gevoelige en selectieve analyses is GAC in staat om in een vroeg stadium de infectiedruk van relevante pathogenen vast te stellen. Door het monitoren van het gewas tijdens de teelt verschuift het accent van curatief naar preventief bestrijden van plantenziekten. Een voorbeeld van monitoring is dat GAC bij een aantal rozentelers de infectiedruk volgt van schimmels en oömyceten die wortelziekten kunnen veroorzaken, waaronder *Phytophthora* en *Pythium*. Afhankelijk van de uitkomst wordt advies gegeven betreffende bestrijding en beheersing van de wortelziekten. Deze aanpak leidt tot een lager gebruik van chemische bestrijdingsmiddelen, minder uitval van planten en een hogere productiviteit.

## Recente ontwikkelingen in de beheersing van *Pythium* bij crocus en hyacint

V.P. Bijman, S. Breeuwsma,  
M. de Boer en J. van der Bent

Praktijkonderzoek Plant en Omgeving,  
sectie Bloembollen, postbus 85,  
2161AB Lisse

*Pythium* is een knelpunt in de bloembollenteelt. Er is nu nog slechts één fungicide, Ridomil Gold, voorhanden en bij langdurig gebruik neemt de effectiviteit van het fungicide af. Na het weglaten van toediening gedurende een paar jaar is het echter weer effectief. In het onderzoek wordt verder de werking van de bacterie *Pseudomonas* A onderzocht. Dit gebeurt in nauwe samenwerking met Jos Raaijmakers (WUR). Ook wordt gekeken naar effecten van tussengewassen, zoals Sarepta mosterd en bladrammenas. Sarepta mosterd is bekend als mogelijke kandidaat voor biofumigatie. Bladrammenas wordt frequent geteeld in de bollentreek en wordt vooral gebruikt tegen erosie en voor onkruidbeheersing.

In het project is zowel gekeken naar de rol van tussengewassen afzonderlijk als naar de combinatie van drie genoemde opties ter beheersing van *Pythium*. De tussengewassen gaven twee jaar op een rij positieve effecten bij het beheersen van *Pythium* bij crocus. Sarepta mosterd in vergelijking met bladrammenas is daarbij ook inzetbaar waar bladrammenas niet geteeld wordt. Het fungicide behandeling was niet significant beter dan de besmette controle.

*Pseudomonas* was beter dan de besmette controle, maar niet

beter of gelijk aan de tussengewassen behandelingen. Bij hyacint waren er geen significante verschillen door de grote spreiding in de proef.

In een andere proef werden (*Fusarium* aantasting) door het gebruik van grotere veldjes wel significante verschillen gevonden. Het gebruik van fungicide in combinatie met een groenbemester leidde tot grotere maten en een verhoogde opbrengst. Ook werden er geen krasbodems (*Fusarium*) gevonden. Vergelijkbare resultaten werden gevonden in een proef met krokus.

Dit onderzoek is onderdeel van het project Bodemweerbaarheid van programma 397 IV

## Duurzame beheersing van papiervlekkenziekte in prei via een modelmatige aanpak

Bart Declercq, Kris De Jonghe  
en Monica Höfte

Laboratorium voor Fytopathologie,  
Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen,  
Universiteit Gent, Coupure Links 653,  
B-9000 Gent, België

Op 1 september 2005 is het IWT-project (Instituut voor de Aanmoediging van Innovatie door Wetenschap en Technologie in Vlaanderen) 'Duurzame beheersing van papiervlekkenziekte in prei via een modelmatige aanpak' van start gegaan. Dit project wordt uitgevoerd door het Laboratorium voor Fytopathologie van de Universiteit Gent (Ugent), het Proefstation voor de Groenteteelt Sint-Katelijne-Waver (PSKW), het Provinciaal Proefcentrum voor de Groenteteelt Oost-Vlaanderen (PCG)

en het Provinciaal Onderzoeks- en Voorlichtingscentrum voor Land- en Tuinbouw (POVLT). De doelstelling van het project is de ontwikkeling van een voorspellingsmodel voor papiervlekkenziekte ter ondersteuning van de geïntegreerde preiteelt.

Voor de belangrijkste plagen in prei, nl. trips (*Thrips tabaci*) en preimot (*Acrolepia assectella*), bestaat een goedwerkend waarschuwingssysteem. Via vangplaten en feromoonvallen worden de plaaginsecten gevangen. Wanneer een kritische drempel (relatie populatie plaagorganisme en economische schade) overschreden is, wordt geadviseerd om in te grijpen.

Voor de ziekten in prei, meer in het bijzonder voor papiervlekkenziekte (*Phytophthora porri*), is de situatie moeilijker. Papiervlekkenziekte veroorzaakt opbrengst- en kwaliteitsverliezen in de herst- en winterteelt van prei en heeft een relatief onvoorspelbaar karakter. Veel neerslag, vochtige omstandigheden en niet al te warme temperaturen kunnen aanleiding geven tot een massale uitbreiding van de ziekte, maar dit gebeurt niet altijd. Een tweede probleem bij de ontwikkeling van een waarschuwingssysteem voor bladvlekkenziekte is dat het bij het waarnemen van de bladvlekken te laat is om in te grijpen. Tussen het moment van infectie en het zichtbaar worden van de vlekken verlopen verschillende dagen tot weken, waardoor de ziekte zich al heeft kunnen uitbreiden vooraleer ze kon worden vastgesteld. Bovendien zijn er geen curatief werkende middelen voorhanden waardoor er preventief moet opgetreden worden. Sinds het proefschrift van W.D. Smilde (1996) is er ook maar weinig verder onderzoek

verricht naar *Phytophthora porri*.

Om gerichter te kunnen bestrijden dient een voorspellingsmodel voor papiervlekkenziekte ontwikkeld te worden. Belangrijke stappen in de ontwikkeling van een voorspellingsmodel zijn kennis verzamelen over de ziekteveroorzaker, over de epidemiologie, over de resistentie van de verschillende preirassen tegen deze ziekte en over de in te zetten gewasbeschermingsmiddelen. Daarna moet deze kennis gebundeld worden in een risicoanalyse en een adviesmodel.

In het eerste werkpakket zal dieper worden ingegaan op de verwekker van de papiervlekkenziekte, *Phytophthora porri*. Isolaten afkomstig van preivelden verspreid over heel Vlaanderen zullen gekarakteriseerd worden aan de hand van genetische en morfologische typing. De pathogeniciteit van de verschillende isolaten zal onderzocht worden in een infectietest. Dit zal ons toelaten om te vertrekken met gekarakteriseerd uitgangsmateriaal. Bovendien weten we dan voor verdere studies of er sprake is van één pathotype *Phytophthora porri* voor prei of dat er verschillende groepen onderscheiden kunnen worden.

In het tweede werkpakket wordt de epidemiologie van papiervlekkenziekte in prei verder bestudeerd aan de hand van kunstmatige infectie. Via kunstmatige infecties is het tijdstip van infectie gekend. Op die manier kan de relatie tussen de verschillende weersparameters en de ziekteontwikkeling beter bepaald worden. In het derde werkpakket wordt de epidemiologie van papiervlekken onder natuurlijke omstandigheden bestudeerd. De relatie tussen de

ziekteontwikkeling en de verschillende weersparameters zal onderzocht worden.

In het vierde werkpakket zal de gevoeligheid van verschillende preirassen tegen papiervlekkenziekte getest worden. In het vijfde werkpakket zal de werking van verschillende fungiciden tegen papiervlekkenziekte nagegaan worden.

In de laatste twee werkpakketten wordt een adviesmodel voor papiervlekkenziekte ontwikkeld dat daarna nog gevalideerd en gefine-tuned moet worden.

#### Referentie:

Smilde, W.D. (1996). *Phytophthora porri* in leek: epidemiology and resistance. Thesis, Wageningen, Landbouw Universiteit Wageningen, 117 p.

## Real-time amplificatie op nanoliter schaal

Peter Bonants<sup>1</sup>,  
Ronald van Doorn<sup>1</sup>,  
Alan Carter<sup>2</sup> en Cor Schoen<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>BioTrove Woburn, MA, USA.

Plant Research International is sinds een aantal jaren bezig met multiplex detectie van plantenpathogenen, waaronder *Phytophthora* spp.: het detecteren van meerdere plantenpathogenen in een monster. Door de toenemende vraag naar kwantitatieve detectie is recentelijk contact gelegd met de firma BioTrove in Boston USA. Deze firma brengt een systeem op de markt om op nanoliterschaal kwantitatieve PCR reacties uit te voeren, de zgn. Thru-Hole™ OpenArray technologie. Het systeem is gebaseerd op arrays van kleine