

## Fungicide

Als fungicide is gekozen voor Ridomil Gold omdat deze van de beschikbare fungiciden het meest wordt toegepast. Na langdurig gebruik kan er sprake van verminderde werking zijn.

Het concept van de gecombineerde strategie berust op een trapsgewijze aanpak ter beheersing van *Pythium*. Tevens gaat de *Pythium* (pathogeen druk) omhoog door isothiocyannaten (biofumigatie) en microbiële activiteit. Toediening van Ridomil Gold bij het planten zorgt voor tijdelijke bescherming van de wortels en /of vermindering van de infectie druk. De werking is van korte duur. Echter, de wortels zijn gedurende de duur van de teelt gevoelig voor infectie door *Pythium*. Het fungicide beschermt de wortels gedurende de tijd die de *Pseudomonas* bacteriën nodig hebben om de jonge kwetsbare wortels te koloniseren. De tot nu toe geteste pseudomonaden hebben diverse ziekte onderdrukkende mechanismen die in staat zijn om pathogene schimmels op afstand te houden of te doden, zoals de productie van antibiotica of van biosurfactants. Momenteel wordt het onderzoek gericht op een isolaat dat o.a. biosurfactants aanmaakt die zoosporen doet barsten. Wanneer de wortel preventief bezet is door de *Pseudomonas*, is deze mogelijk voor de duur van de teelt beschermd tegen *Pythium*.

## Resultaten geïntegreerde beheersing

Uit de crocus proef van dit jaar (fig. 1 en fig. 2) blijkt dat bladrammenas resulteert in de hoogste ziekteonderdrukking. Dit effect is geen bemestings effect (zie figuur 1). Behandelingen als, Sarepta mosterd met bladrammenas, Sarepta mosterd + *Pseudomonas* A +1/10 Ridomil Gold en Sarepta Mosterd + 1/10 Ridomil Gold waren niet significant verschillend van bladrammenas.

Biofumigatie door toepassing van Sarepta Mosterd had weinig effect. De behandeling met *Pseudomonas* stam A resulteerde ook in een goede ziekteonderdrukking.

De lage doseringen van 1/10 Ridomil Gold was niet effectief in de veldproef terwijl deze dosering wel in ziekteonderdrukking resulteerde in biotoetsen onder geconditioneerde omstandigheden. Dus combinaties van maatregelen gaven een aanzienlijk beter resultaat dan de besmette controle en de toepassing van Ridomil Gold (volle dosering en 1/10 dosering).

In de hyacintenproef bleek de enorme variatie tussen de veldjes van één behandeling te leiden tot niet significante verschillen van alle behandelingen t.o.v. de controle. De tendens lijkt aanwezig dat de combinatie van maatregelen of alleen het toepassen van tussen-gewassen voor hyacint ook positief uitpakt voor *Pythium* beheersing.

De strategie van combinatie van maatregelen wordt momenteel ook op praktijkpercelen uitgetest. Op twee praktijkpercelen wordt de combinatie van bladrammenas en Ridomil Gold uitgetest. Bij een aantal telers wordt de *Pseudomonas* bacterie uitgetest in een enkele toepassing en gecombineerd met Ridomil Gold.

Bij één teler (uit Telen met Toekomst) wordt momenteel het effect van de combinatie van alle maatregelen op een praktijkperceel onderzocht.

## Activiteit van cyclische lipopeptide surfactants tegen pathogene Oomyceten

J.M. Raaijmakers<sup>1</sup>, H. Tran Thi Thu<sup>1</sup>,  
M. de Boer<sup>2</sup>, C.F. Geerds<sup>1</sup>, P. de Waard<sup>3</sup>,  
T.A. van Beek<sup>4</sup>, J.T. de Souza<sup>1</sup> and A. Ficke<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Phytopathology, Wageningen University, P.O. Box 8025, 6709 PG Wageningen; <sup>2</sup> Applied Plant Research, section Flowerbulbs, Lisse; <sup>3</sup> NMR Centre, Wageningen University; <sup>4</sup> Natural Products Chemistry group, Laboratory of Organic Chemistry, Wageningen University, the Netherlands.

Oomyceten vormen een diverse groep van schimmelachtige microorganismen en herbergen een reeks economisch belangrijke pathogenen van planten, insecten, vissen en dieren. Het voorkomen van agressieve en fungicide-ongevoelige stammen van Oomyceten alsmede het wereldwijde beleid om de duurzaamheid van de land- en tuinbouw te stimuleren hebben geleid tot een toenemende vraag naar nieuwe methoden om deze pathogenen te beheersen. Ten aanzien van biologische bestrijding van Oomyceten hebben recente studies in ons laboratorium geleid tot de isolatie en identificatie van verschillende isolaten van *Pseudomonas fluorescens* die oppervlakte-actieve stoffen produceren, zgn. surfactants, met een destructief effect op zoösporen van Oomyceten. Een van deze isolaten, *Pseudomonas fluorescens* R1SS101, produceert tenminste 5 extracellulaire surfactants, waarvan één geïdentificeerd is als een cyclisch lipopeptide bestaande uit negen aminozuren en een 10-C vetzuur. Dit cyclisch lipopeptide heeft niet alleen een destructief effect op zoösporen maar tevens een remmende werking op myceliumgroei van verscheidene Oomyceten en plantenpathogene schimmels, waaronder *Pythium aphanidermatum* en *Phytophthora* soorten. Toediening van *Pseudomonas fluorescens* R1SS101 aan grond of bloembollen resulteerde in een effectieve bestrijding van *Pythium* wortelrot van hyacint en krokus in zowel kleinschalige bi-

otoetsen als veldexperimenten. In substraatteelt-assays was toediening van isolaat R1SS101 of van de surfactants zelf erg effectief en consistent in onderdrukking van *Pythium aphanidermatum* in komkommer. De cyclische lipopeptide surfactants geproduceerd door *Pseudomonas fluorescens* R1SS101 geven een sterke reductie in oppervlaktespanning en dragen tevens bij aan de beweeglijkheid en verspreiding van isolaat R1SS101. Genetische analyse heeft geleid tot de identificatie van meerdere genen die betrokken zijn bij de biosynthese en regulatie van surfactants in *P. fluorescens* R1SS101. Huidig onderzoek richt zich op genetische analyse en op de effectiviteit van cyclische lipopeptiden in de beheersing van diverse Oomyceten.

## ***Pythium*, fylogenie en soortsafgrenzingen**

Arthur de Cock<sup>1</sup>, André Lévesque<sup>2</sup>,  
Andrew Schurko<sup>3</sup>, James Bedard<sup>3</sup> en  
Glen Klassen<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centraalbureau voor Schimmelcultures, Postbus 85167,  
3508 AD Utrecht

<sup>2</sup> Environmental Health Program - Biodiversity, Agriculture  
and Agri-Food Canada, 960 Carling Avenue, Ottawa,  
ON K1A 0C6, Canada

<sup>3</sup>Department of Microbiology, University of Manitoba,  
Winnipeg, Manitoba, R3T 2N2 Canada

Van alle thans beschikbare soorten en variëteiten van *Pythium* werd de ITS van het nucleaire ribosomale DNA gesequentieerd en geanalyseerd met parsimonie zowel als phenetische methodes. Van de helft van de soorten werd ook het D1, D2 en D3 gebied van het aangrenzende 28S rRNA gen gesequentieerd. De fylogenie op basis van het 28S was congruent met die op basis van de ITS. Bij het onderzoek waren alle nog bestaande ex-type stammen betrokken, evenals 20 sequenties van recentelijk beschreven soorten van GenBank. Soorten waarvan geen ex-type beschikbaar was werden vertegenwoordigd door een authentieke stam (6), stammen die door Van der Plaats-Niterink gebruikt zijn in haar Monograph of the Genus *Pythium* (33) of stammen die geselecteerd waren op morfologische kenmerken (17). Parsimonie analyse genereerde twee hoofdclusters die de *Pythium* soorten vertegenwoordigen met resp. filamenteuze en bolvormige sporangia. Een kleine cluster met "contiguous" sporangia werd gevonden tussen deze twee clades. Dit type is morfologisch een tussenvorm tussen filamenteus en bolvormig.

In totaal werden 11 kleinere clusters onderscheiden die vaak correleerden met waardplant-type of sub-

straat en in verschillende gevallen met een subset van morfologische kenmerken (b.v. oogonium ornamentatie). Echter, veel kenmerken die in de taxonomie van *Pythium* gebruikt worden, zoals antheridium positie, afmetingen van oogonia, etc., correleerden niet of nauwelijks met de fylogenie.

Een vergelijking van de ex-type en representatieve stammen met alle ITS sequenties van *Pythium* in Genbank toonde beperkte infraspecifieke variatie behalve bij *P. rostratum*, *P. irregulare*, *P. heterothallicum* en *P. ultimum*. Het totale aantal soorten dat onderzocht werd bedroeg 116 (inclusief 60 type strains). Zesentwintig soorten hadden ITS sequenties die identiek of bijna identiek waren met eerder beschreven soorten, hetgeen op conspecificiteit duidt. Een groot aantal isolaten (ruim 500) werd behalve met sequencing ook met andere moleculaire methoden onderzocht (RADP, restrictieanalyse van ITS en IGS). Dit toonde aan dat 26 soorten in meerdere of mindere mate heterogeen zijn. Extreme heterogeniteit werd gevonden in b.v. *P. violae* en *P. rostratum* die beide uit drie verschillende soorten blijken te bestaan. Soorten met identieke ITS sequenties bleken meestal ook met andere methodes identiek en kunnen als conspecificiek beschouwd worden.

## ***De wortelpathoogeen Pythium myriotylum bij cocoyam: een nieuw species?***

Maaïke Perneel en Monica Höfte

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

Cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*), een knolgewas uit de *Araceae* familie, voorziet miljoenen mensen in de tropen en subtropen in hun dagelijkse behoeften aan koolhydraten, proteïnen, vetten en essentiële vitamines. Ook in Kameroen is cocoyam na maniok het belangrijkste voedselgewas. De productie van cocoyam is verre van optimaal te wijten aan wortelrot, een ziekte die enorme oogstverliezen veroorzaakt. De bodempathoogeen verantwoordelijk voor wortelrot werd morfologisch geïdentificeerd als *Pythium myriotylum*. Hoewel *P. myriotylum* beschreven staat als een pathoogeen met een breed waardplantenspectrum, toonde onderzoek aan dat *P. myriotylum* isolaten van cocoyam een zeer nauw gastheerspectrum hebben. Bovendien bleken cocoyamisolaten een lager optimum groeitemperatuur te vertonen en konden ze op basis van esterasepatronen onderscheiden worden van *P. myriotylum* isolaten van andere waardplanten. In deze studie werden 40 *P. myriotylum* isolaten af-