

Bestrijding van *Phytophthora*-vruchtrot bij peer (Conference)

Marcel Wenneker, Rik de Werd en Khanh Pham

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving,
onderdeel van Wageningen UR
Business Unit Bloembollen,
Boomkwekerij & Fruit
December 2014

Rapportnr.
2014-15

© 2014 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit

DLO is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Rapportnummer 2014-15; € 15,- -

Projectnummer: 32 350112 00

PT-nummer: 14633

Productschap  Tuinbouw

**Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, onderdeel van Wageningen UR
Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit**

Adres : Lingewal 1, 6668 LA Randwijk
Postbus 200, 6670 AE Zetten
Tel. : +31 (0)488 473702
Fax : +31 (0)488 473717
E-mail : info.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

| | |
|--|----|
| SAMENVATTING..... | 5 |
| 1 INLEIDING | 7 |
| 2 <i>PHYTOPHTHORA</i> VRUCHTROT BIJ PEREN | 9 |
| 2.1 <i>Phytophthora</i> | 9 |
| 2.2 Levenscyclus..... | 9 |
| 2.3 Symptomen..... | 10 |
| 2.4 Infectieroutes en beheersing <i>Phytophthora</i> | 11 |
| 2.5 <i>Phytophthora</i> als quarantaineziekte | 11 |
| 3 DIAGNOSTIEK EN DETECTIE VAN <i>PHYTOPHTHORA</i> | 13 |
| 3.1 Diagnostiek | 13 |
| 3.2 Moleculaire detectie | 13 |
| 3.3 Taqman-PCR..... | 13 |
| 3.4 Validatie | 14 |
| 3.5 Ontwikkeling Taqman PCR voor <i>Phytophthora</i> | 14 |
| 4 OPPERVLAKTEWATER ALS MOGELIJKE BESMETTINGSBRON | 15 |
| 4.1 Aanleiding voor onderzoek..... | 15 |
| 4.2 Uitvoering onderzoek oppervlaktewater | 15 |
| 4.2.1 Protocol: water testen op aanwezigheid van <i>Phytophthora</i> | 15 |
| 4.2.2 Identificatiemethoden | 15 |
| 4.2.3 Uitvoering in de praktijk..... | 15 |
| 4.3 Resultaten en discussie | 17 |
| 5 DISCUSSIE EN CONCLUSIES | 19 |
| 6 LITERATUUR..... | 21 |

Samenvatting

In de afgelopen jaren werd op verschillende perenpercelen (zware) aantasting met *Phytophthora*-vruchtrot vastgesteld. Ook in de bewaring werd aantasting van *Phytophthora* geconstateerd.

Naar aanleiding daarvan is een project gestart met de volgende doelstellingen:

- Het leveren van basiskennis over de epidemiologie en infectiewijze van *Phytophthora* bij peer.
- Aanzet voor ontwikkelen van mogelijke bestrijdingsstrategieën voor *Phytophthora*-vruchtrot.

Phytophthora is een bodemschimmel die vooral aantasting kan geven wanneer de periode voor en tijdens de pluk uitzonderlijk nat is, zodat sporen vanuit de bodem met opspattende gronddeeltjes laaghangende vruchten kunnen infecteren. Ook bij de natte sortering kunnen de sporen van de schimmel zich verspreiden in het proceswater en gezonde vruchten aantasten. *Phytophthora* vruchtrot wordt voornamelijk veroorzaakt door *Phytophthora syringae* en *P. cactorum*, maar ook andere soorten kunnen voorkomen in Europa. *P. syringae* heeft in onder andere China een quarantaine status. *Phytophthora* is afhankelijk van vrij water tijdens verschillende kritische stadia van zijn levenscyclus, in het bijzonder voor de productie en verspreiding van zoösporen. *Phytophthora* kan ook via de beregeningsinstallatie worden verspreid, wanneer geïnfecteerd slotwater wordt gebruikt.

Door het diagnostiekcentrum van PPO-Lisse zijn voor deze twee *Phytophthora*-soorten nu wel Taqman PCR's nu ontwikkeld en getoetst, met ondermeer natuurlijk besmette vruchten en sorteewater van fruitsorteerinstallaties. De resultaten van de Taqman-PCR werd vergeleken met de klassieke diagnostische toetsen. De Taqman PCR gaf steeds vergelijkbare resultaten. Ook werd de specificiteit getoetst met een groot aantal andere schimmelsoorten (waaronder *Botrytis*, schurft, en een aantal verwante *Phytophthora*-soorten). Ook hieruit bleek de Taqman goed te voldoen. De toetsen die in Lisse ontwikkeld zijn moeten nog een aantal van de validatiestappen doorlopen voordat ze als een routinetoets gebruikt kunnen worden.

In het onderzoek zijn een aantal *Phytophthora*-soorten gevonden, waaronder *P. plurivora*, *P. 'Salixsoil'* en *P. inundata*. Op alle locaties werden wel één of meerdere *Phytophthora*-soorten in het oppervlaktewater gevonden. Dit ligt in de lijn van de voorspelling van vooraanstaande onderzoekers die al enige jaren laten zien dat de risico's op uitbreiding van onbekende *Phytophthora*'s ernstig toeneemt. *P. cactorum* of *P. syringae* werden echter niet aangetroffen. Het herhalen van het onderzoek zou wenselijk zijn.

Aanbevelingen uit het onderzoek:

- De 'bait'-methode kan bruikbaar zijn voor de praktijk om een perceel (boomgaard) te laten testen op aanwezigheid van *Phytophthora*. Er is meer onderzoek nodig om de methode praktijkrijp te maken.
- Met behulp van een snelle detectiemethode (bv Taqman PCR) is te bepalen of er inderdaad *Phytophthora* aanwezig is. Positieve monsters kunnen verder worden onderzocht om te bepalen om welke *Phytophthora*-soort het gaat. Taqman PCR kan ook gebruikt worden als van een kwantitatieve toets voor de bepaling aanwezigheid *Phytophthora* in de grond (inoculum potentieel). Hiermee kunnen risicopercelen beter geïdentificeerd worden.
- Verder onderzoek naar infectieroutes is wenselijk. Welke routes zijn het meest belangrijk: via bodem (opspattende gronddeeltjes) en/of beregeningswater.
- Effectiviteitsproeven met vruchten zonder verwonding waarbij infectie ontstaat zijn nog niet beschikbaar. Productie van zoösporen voor infectieproeven is nog steeds moeilijk. Kennis over een toetsmethode voor infectieproeven (en middelen testen) moet ontwikkeld worden.
- Met deze infectiemethode kunnen vervolgens experimenten uitgevoerd worden om voor- en naogst behandelingen te toetsen.

1 Inleiding

In de afgelopen jaren werd op verschillende perenpercelen (zware) aantasting met *Phytophthora*-vruchtrot vastgesteld. Ook in de bewaring werd aantasting van *Phytophthora* geconstateerd. Door de fruitsector wordt *Phytophthora* als een serieus probleem beschouwd (Vliegen-Verschure, 2010). Door CAF/Vepaf en FruitConsult zijn in 2010 enquêtes onder perentelers uitgevoerd.

De voornaamste resultaten en conclusies uit deze onderzoeken waren:

- Vaak wordt aantasting van peer gevonden, terwijl appel in principe ook gevoelig voor infectie is. Aantastingen worden vaak laat in het seizoen gevonden (zichtbaar).
- De indruk is dat ondergroei geen remmend effect op de aantasting lijkt te hebben: mogelijk vinden infecties al vroeg in het seizoen plaats.
- Veel spuiten - met captan en Bellis - lijkt minder aantasting te geven.
- Captan lijkt de beste werking te hebben, gevolgd door Bellis en Delan. Switch en Flint lijken niet te werken (voorlopig resultaat van onderzoek PC-fruit Gorsem).
- Beregenen met oppervlaktewater lijkt de kans op infectie en aantasting te vergroten.
- Het precieze bestrijdingsmoment is onbekend.
- Het gebruik van gewasbeschermingsmiddelen moet geminimaliseerd worden o.a. vanwege de residu-eisen die door de retail gesteld worden.
- In de residu-arme teelt van peren wordt met name *Phytophthora*-vruchtrot als één van de grootste risico's gezien.

Naar aanleiding van bovenstaande is een project gestart met de volgende doelstellingen:

- Het leveren van basiskennis over de epidemiologie en infectiewijze van *Phytophthora* bij peer.
- Aanzet voor ontwikkelen van mogelijke bestrijdingsstrategieën voor *Phytophthora*-vruchtrot.

2 *Phytophthora*-vruchtrot bij peren

2.1 *Phytophthora*

Phytophthora is een oömyceet, een pseudoschimmel. In eerste instantie lijkt *Phytophthora* een schimmel, want het maakt schimmeldraden (mycelium), maar genetische analyse heeft aangetoond dat *Phytophthora* niet verwant is met echte schimmels, maar wel met algen. Daarom wordt *Phytophthora* aangeduid als pseudoschimmel. Het geslacht *Phytophthora* omvat plantpathogenen die in staat zijn volkomen gezonde planten en bomen te infecteren en ten gronde te richten (Covey & Harris, 1990; Kuik, 2014).

Phytophthora is een bodemschimmel die vooral aantasting kan geven wanneer de periode voor en tijdens de pluk uitzonderlijk nat is, zodat sporen vanuit de bodem met opspattende gronddeeltjes laaghangende vruchten kunnen infecteren. Ook bij de natte sortering kunnen de sporen van de schimmel zich verspreiden in het proceswater en gezonde vruchten aantasten (Ceustermans & Creemers, 2012). *Phytophthora* vruchtrot wordt voornamelijk veroorzaakt door *Phytophthora syringae* en *P. cactorum*, maar ook andere soorten kunnen voorkomen in Europa (Covey & Harris, 1990). *Phytophthora*-vruchtrot bij appel en peer is een wereldwijd probleem (Dobra et al., 2011; Lindner, 2009; Persen et al., 2014; Spotts & Grove, 2002). *P. cactorum* is meer actief bij hogere temperaturen (12-18 °C), terwijl *P. syringae* meer belangrijk is bij lagere temperaturen (10-14 °C) (Harris & Xu, 2003). *Phytophthora* is afhankelijk van vrij water tijdens verschillende kritische stadia van zijn levenscyclus, in het bijzonder voor de productie en verspreiding van zoösporen (Grove & Boal, 1991). Het samengaan van belangrijke aantastingen door *Phytophthora*-vruchtrot met natte zomers is ook algemeen bekend. *Phytophthora*-vruchtrot is ook te herkennen aan de onaangename geur van de aangetaste vruchten. Dezelfde schimmels kunnen ook stambasisrot veroorzaken op verschillende appel- en perenrassen en onderstammen (Elena & Paplomatas, 1999).

2.2 Levenscyclus

Phytophthora heeft een levenscyclus die grotendeels plaatsvindt onder de grond, bij gunstige omstandigheden vindt ook een bovengrondse cyclus plaats. Rustsporen kunnen wel tien jaar overleven in de grond zonder zelfs een waardplant in de buurt. Eens in de zoveel jaar speelt het probleem op in de fruitteelt, wanneer de omstandigheden voor *Phytophthora* gunstig zijn worden vruchten aangetast. *Phytophthora* is een ziekte die door opspattend water, de vruchten die het laagst bij de grond hangen kan infecteren. Tegenwoordig zijn er ook percelen waarbij aantastingen/vruchtinfecties bovenin de boom veelvuldig voorkomen, mogelijk door verspreiding van *Phytophthora*-sporen via beregening (Yamak et al., 2002). In Amerika wordt *Phytophthora* rot vanwege deze verspreiding 'Sprinkler rot' genoemd. Bij jonge aanplanten in een perceel met door *Phytophthora* besmette grond kan het ook de groei van jonge perenbomen bemoeilijken door aantasting van de wortels. De bekende *Phytophthora* op aardappel, *P. infestans*, is ongevaarlijk voor fruitgewassen.

De levenscyclus van *Phytophthora* in boomgaarden is relatief complex. De schimmel overleeft als oösporen (rustsporen), die hoofdzakelijk geproduceerd worden in afgevallen bladeren, wanneer de omstandigheden ongunstig zijn voor de overleving van actieve stadia (bijvoorbeeld bij droogte). Deze rustsporen kunnen jarenlang overleven in de bodem. De eerste stap voor activatie is de kieming van deze dikwandige structuren waarbij een vochtige bodem nodig is. De kieming van oösporen geeft aanleiding tot een of twee sporangia. Deze sporangia produceren 20-30 bewegelijke zoösporen (zwemsporen), die in staat zijn om vruchten te infecteren via de lenticellen, wanneer vrij water redelijk snel beschikbaar is na de kieming van de oösporen. De sporangia die niet kiemen kunnen gedurende een korte periode overleven, of kiemen om een secundaire sporangium te produceren. Het is onbekend hoe lang actieve maar ongekiemde zoösporen kunnen overleven wanneer de bodem begint droog worden. Deze ontwikkelingsstrategieën geven de schimmel een aanzienlijke flexibiliteit in het reageren op onderbroken natte omstandigheden.

2.3 Symptomen

De lesies zijn bleek tot matig bruin bij appel (figuur 1a,b) en donkerbruin bij peer (figuur 2a,b). De overgang tussen gezond en aangetast vruchtweefsel is niet scherp begrensd. Het aangetaste vruchtweefsel is vaak redelijk stevig, maar kan in een later stadium sponsachtig worden. De vaatbundels vertonen vaak een duidelijke bruinverkleuring. Onder vochtige omstandigheden kan er myceliumgroei uit de lenticellen plaats vinden. Maar meestal is de marmerkleurige verkleuring van de schil het meest typische symptoom dat wordt waargenomen. Deze symptomen zijn in de boom en boomgaard vaak goed waarneembaar.

Phytophthora-vruchtrot bij peer kan verward worden met infecties van bacterievuur (*Erwinia amylovora*; figuur 3). Bij bacterievuur ontstaan bij hogere temperaturen en vochtige omstandigheden ook vaak kleine, kleverige druppeltjes bacterieslijm op de vruchten. Bacterievuur ontstaat vaak bij hoge zomerse temperaturen (>20 °C), en samengaande hagelbuien die wonden veroorzaken die vervolgens geïnfecteerd worden. Daarnaast vindt er bij een bacterievuur-aantasting meestal ook scheutaantasting plaats. Deze aantasting kan makkelijk herkend worden aan het krullen van de jonge aangetaste scheuten, en het zwart verkleuren, verdorren en verschrompelen van bloesem, bladeren en twijgen (de zogenaamde vaantjes).



Figuur 1 a,b: *Phytophthora syringae* aantasting bij appel.



Figuur 2 a,b: *Phytophthora cactorum* aantasting bij peer.



Figuur 3: *Erwinia amylovora* aantasting bij peer.

2.4 Infectieroutes en beheersing *Phytophthora*

De grootste kans op *Phytophthora*-vruchtrot treedt op wanneer de periode voor en tijdens de pluk uitzonderlijk nat is, zodat sporen vanuit de bodem met opspattende gronddeeltjes laaghangende vruchten kunnen infecteren. Verschillende aandachtspunten kunnen aantasting van *Phytophthora* voorkomen. Voor een nieuwe aanplant is van belang dat de ontwatering van een perceel goed is. Snelle afvoer van water is van belang bij een regenbui. *Phytophthora* kan zelfs voor uitval van jonge bomen zorgen door de wortels aan te tasten, daarom is het van belang om optimale omstandigheden te creëren voor de weggroei. Als de grond onder de bomen vrij van onkruid wordt gehouden (algemeen beschouwd als een goede boomgaardpraktijk om de vochtigheid van de bodem te bewaren), spatten bodemdeeltjes omhoog bij hevige regenbuien en zoosporen komen in contact met laaghangend fruit. Infectie is dan te voorkomen door gras naar de boom toe laten groeien. Deze ondergroei van gras voorkomt dat *Phytophthora*-sporen met opspattend water de vruchten bereiken. Ook de boomhoogte is van belang. In de literatuur is gevonden dat zelfs tot een meter hoogte regulier aangetaste vruchten worden gevonden, maar de infectiekans is duidelijk groter naarmate het fruit lager hangt. Ook kan het in de loop van het seizoen weer van laaghangende vruchten opspatten naar hoger hangende vruchten. Voorkom dus met snoei, opbinden of gebruik maken van jukken dat de peren te laag hangen (Anonymous, 2014).

Phytophthora kan ook via de beregeningsinstallatie worden verspreid, wanneer geïnfecteerd slootwater wordt gebruikt. Dit is voor een groot aantal teelten aangetoond, waaronder citrus (Whiteside & Oswald, 1973), boomkwekerijen (Ufer et al., 2008; Ghimire et al., 2011) en perenboomgaarden (Yamak et al., 2002). Wanneer veel peren bovenin de boom besmet zijn is de kans op besmet water aanwezig. Het is moeilijk *Phytophthora* direct in een watermonster aan te tonen. Het is wel mogelijk via een omweg, met gebruik een vanggewas (Bonants et al., 2004).

Nat weer voor de oogst kan tot directe infectie leiden, dat gebeurt via natuurlijke openingen (lenticellen). Symptomen van vruchtrot kunnen al zichtbaar worden op de boom of later tijdens de bewaring. Het rot kan zich hier dan via myceliumgroei van de schimmel verder verspreiden naar aangrenzende gezonde vruchten tot nestrot.

Vruchten die geïnfecteerd worden tot 2 á 3 weken voor de oogst zullen rot ontwikkelen op de boom. Bij latere infecties worden symptoomloze vruchten geoogst waarbij het rot pas tot expressie komt tijdens de bewaring. Ook via natte sortering kan het proceswater besmet worden met de sporen van *Phytophthora* en kunnen zo gezonde vruchten geïnfecteerd worden (Ceustermans & Creemers, 2012).

Bestrijding van de rustsporen in de bodem lijkt zeer moeilijk, onder andere vanwege het ontbreken van effectieve middelen. Toch kan de bodem de meest aangewezen plek om deze pseudoschimmel bij de bron aan te pakken in plaats van op het fruit. Juist in deze tijd waarbij de markteisen op het gebied van residu erg streng zijn, is veel eraan gelegen fruit niet te hoeven bespuiten maar de infectiebron weg te nemen.

2.5 *Phytophthora* als quarantaineziekte

De Chinese overheid benoemde diverse ziekten en plagen als risico bij de export van Nederlandse peren naar China. Deze zijn opgenomen in het protocol dat de Nederlandse en China overheid hebben getekend. Geen van deze ziekten en plagen mag op peren in China worden aangetroffen. De verwachting is dat de Chinese overheid, zeker de eerste jaren, veel peren uit Nederland zal controleren (NFO & FrugiVenta, 2014).

P. syringae staat als quarantaineziekte genoemd in het Chinese protocol. *P. cactorum* staat niet in dit protocol genoemd als quarantaineziekte. Deze specifieke schimmel komt namelijk al voor in China op peer (Shang et al., 2011).

3 Diagnostiek en detectie van *Phytophthora*

3.1 Diagnostiek

Voor de bestrijding en het voorkomen van infecties is het belangrijk om te weten welke *Phytophthora*-soort in de boomgaard of mogelijk oppervlaktewater aanwezig is. Daarnaast is het van belang om te weten of het om een quarantaine-soort gaat. De identificatie van de precieze *Phytophthora*-soort is niet mogelijk op basis van de symptomen op vruchten of aangetaste stammen. Wanneer de veroorzaker van de aantastingen in het laboratorium uit het aangetaste plantenmateriaal worden opgekweekt op voedingsbodems, kan op morfologische kenmerken soms wel de soort bepaald worden. Dit is echter een tijdrovende bezigheid, en vereist tevens specialistische kennis en vaardigheden (Bonants et al., 2004).

Conventionele methoden om plantpathogenen en -aantasters te identificeren zijn o.a. visuele beoordeling van de aangetaste plant, isolatie en kweek van de organismen, morfologische analyse en biochemische testen, zoals serologische bepalingen of vetzuuranalyse. Daarnaast wordt er in toenemende mate gebruik gemaakt van moleculair biologische technieken (Kox & Roenhorst, 2004).

3.2 Moleculaire detectie

Moleculaire technieken kunnen een goed hulpmiddel zijn bij de identificatie van de precieze veroorzaker van de aantasting. Op basis van dna-materiaal kan de identificatie plaats vinden. De diagnostiek van plantenziekten en -plagen heeft met het gebruik van moleculair biologische technieken de laatste jaren grote vooruitgang geboekt. Voor veel plantpathogenen en aantasters zijn detectie en identificatiemethoden ontwikkeld die gebaseerd zijn op deze technieken. Moleculair biologische technieken zijn over het algemeen snel, gevoelig en specifiek en bieden daardoor een alternatief voor de conventionele methoden of leveren een waardevolle aanvulling.

De meest gebruikte moleculair biologische techniek is de polymerase ketting reactie (polymerase chain reaction, PCR). Met deze techniek wordt een deel van het genoom enzymatisch vermeerderd in herhaalde cycli van DNA-synthese, waarbij tijdens elke cyclus hetzelfde stukje DNA verdubbeld wordt. Welk stuk van het genoom vermeerderd wordt, wordt bepaald door de samenstelling (nucleotidenvolgorde) van de primers. Dit zijn kleine stukjes synthetisch DNA, oligonucleotiden, die het enzym nodig heeft om de DNA synthese te starten. Primers kunnen zodanig gekozen worden dat ze uniek (soort-specifiek) of juist generiek (groep-specifiek) zijn. Na dertig cycli, uitvoerbaar binnen twee tot drie uur, zijn meer dan een miljard DNA moleculen (PCR-producten) in het reactiemengsel aanwezig. Deze kunnen worden aangetoond door middel van agarose gel electrophorese, waarbij de PCR-producten gescheiden worden op grond van hun fysische eigenschappen. Indien nodig kan een verdere analyse van PCR-producten uitgevoerd worden door middel van 'sequencing' (bepalen van de nucleotidenvolgorde), 'restriction fragment length polymorfism (RFLP) analysis', of hybridisatie met een gelabelde 'probe'. Hybridisaties kunnen overigens ook uitgevoerd worden met nucleïnezuur dat niet vermeerderd is door PCR (Kox & Roenhorst, 2004).

3.3 Taqman-PCR

Het is mogelijk om de detectie van PCR producten gelijktijdig met de PCR uit te voeren in een zogenoemde real-time PCR of Taqman-PCR. Hierbij wordt het PCR product al tijdens de PCR aangetoond door middel van aspecifieke inbouw van een fluorescerende stof (SYBR Green) of door middel van hybridisatie met een fluorescerende probe. Dit gel-vrije systeem verkort de analysetijd aanzienlijk (Kox & Roenhorst, 2004). Alle organismen bevatten DNA en/of RNA met informatie die specifiek is voor dat organisme. Door hiervan gebruik te maken, kunnen unieke TaqMan PCR-methoden ontwikkeld worden die een organisme gevoelig en kwantitatief kunnen aantonen in plantmateriaal, lucht, water, substraat en grond. De TaqMan PCR is gebaseerd op polymerase kettingreactie (PCR).

Hiermee wordt de specifieke DNA- en/of RNA-informatie van één bepaald organisme tijdens vermenigvuldiging real-time zichtbaar gemaakt.

Voordelen van Taqman PCR:

- De methode is zeer gevoelig
- Breed toepasbaar voor organismen die RNA en/of DNA bevatten
- Kwantitatief: de hoeveelheid van het organisme kan worden bepaald
- One tube assay: alles in één buisje
- High throughput: vele analyses tegelijkertijd
- Multiplex: Meerdere organismen tegelijkertijd tot ongeveer 3 à 4

3.4 Validatie

Voor veel plantpathogenen en -aantasters zijn inmiddels moleculair biologische detectie- en identificatiemethoden ontwikkeld. Voordat een ontwikkelde moleculaire toets echter routinematig kan worden toegepast, moet deze (net als iedere andere toets) gevalideerd worden op de relevante technische aspecten. Hierbij spelen de volgende factoren een rol:

- het doel van de toets: routinematige toetsing of eenmalige diagnose?
- specificiteit: worden alle varianten van het target organisme aangetoond; treden kruisreacties op?
- gevoeligheid: hoeveel organismen, cellen, moleculen nucleïnezuur, kunnen aangetoond worden?
- herhaalbaarheid: geeft de toets bij herhaling hetzelfde resultaat?

3.5 Ontwikkeling Taqman PCR voor *Phytophthora*

Voor verschillende *Phytophthora*-soorten, waaronder *Phytophthora ramorum*, zijn Taqman PCR's ontwikkeld (Chandelier et al., 2006; Hayden et al., 2006; Tomlinson et al., 2005). Deze technieken kunnen gebruik worden voor het aantonen van specifieke *Phytophthora*-soorten in bijvoorbeeld grond of water. Voor *P. syringae* en *P. cactorum* zijn nog geen Taqman PCR's beschikbaar.

Door het diagnostiekcentrum van PPO-Lisse zijn voor deze twee *Phytophthora*-soorten nu wel Taqman PCR's nu ontwikkeld en getoetst, met ondermeer natuurlijk besmette vruchten en sorteewater van fruitsorteerinstallaties. De resultaten van de Taqman-PCR werd vergeleken met de klassieke diagnostische toetsen. De Taqman PCR gaf steeds vergelijkbare resultaten. Ook werd de specificiteit getoetst met een groot aantal andere schimmelsoorten (waaronder *Botrytis*, schurft, en een aantal verwante *Phytophthora*-soorten). Ook hieruit bleek de Taqman goed te voldoen.

De toetsen die in Lisse ontwikkeld zijn moeten nog een aantal van de validatiestappen doorlopen voordat ze als een routinetoets gebruikt kunnen worden.

4 Oppervlaktewater als mogelijke besmettingsbron

4.1 Aanleiding voor onderzoek

In 2010 en 2011 zijn perenmonsters van zes percelen met verdenking van *Phytophthora*-vruchtrot onderzocht (figuren 4 a,b). Waarbij op drie percelen monsters zijn genomen van zowel laag uit de boom als hoog uit de boom. Uit deze verzamelde peren zijn eerst schimmels geïsoleerd en gekweekt op voedingsbodems. Daarna is beoordeeld welke soort *Phytophthora* het betrof, voor dit onderzoek heeft PPO-Lisse (afdeling diagnostiek) samengewerkt met de Nvwa. De uitslag was eenduidig: in alle gevallen betrof het *Phytophthora cactorum*. Opvallend genoeg bleken ook vruchten hoog uit de boom besmet met deze schimmel. Het is onwaarschijnlijk dat deze vruchten via opspattende gronddeeltjes besmet zijn geraakt. Wel bleken de percelen beregend te zijn.

4.2 Uitvoering onderzoek oppervlaktewater

Op acht locaties in Nederland waar in 2010 (zwarte) vruchtrot door *Phytophthora* was vastgesteld, werd het oppervlaktewater onderzocht (figuren 5 a,b en 6 a,b). Een goede methode hiervoor is het gebruik van een baittechniek, dus het 'vangen' van sporen van *Phytophthora* in water met behulp van een vanggewas (Rhododendronbladeren). Hieronder staat het protocol daarvoor beschreven.

4.2.1 Protocol: water testen op aanwezigheid van *Phytophthora*

In het te testen water wordt een gaasje gehangen met daarin een aantal Rhododendronbladeren. De bladeren fungeren als loksubstraat. Kies bladeren die gaaf zijn, dus zonder bruine plekjes etc. Het gaasje blijft drijven, net onder het wateroppervlak. Eventuele aanwezige zoosporen van *Phytophthora* bewegen zich actief naar de Rhododendronbladeren, kiemen en groeien de bladeren in. Na 3-5 dagen wordt het gaasje uit het water gehaald en worden de bladeren goed afgespoeld met leidingwater.

De bladeren worden in een plastic zakje gedaan, gecodeerd en verstuurd naar een laboratorium dat ervaring heeft met *Phytophthora*-detectie. Aangekomen in het laboratorium worden de bladeren goed afgedroogd. Bij een positieve reactie, dus wanneer *Phytophthora* aanwezig was, dan is dat zichtbaar aan kleine waterige, soms al wat bruine vlekjes in het blad. In het geval dat er geen vlekjes te zien zijn, worden de bladeren nog enige dagen bewaard bij kamertemperatuur. Verdachte bruine plekjes in de bladeren worden uitgesneden en getoetst op aanwezigheid van *Phytophthora*. Dit is de identificatie-stap.

4.2.2 Identificatiemethoden

Verschillende identificatiemethoden zijn mogelijk, vaak worden ze alle drie gebruikt:

1. de geselecteerde stukjes blad worden uitgelegd op een semiselectief medium, bv. PVPH-medium. Dit medium selecteert op *Phytophthora* en onderdrukt bacteriën en schimmels. Bij de beoordeling van uitgroei, na 3-7 dagen is een deskundige nodig die het verschil kan zien tussen bijvoorbeeld *Pythium* en *Phytophthora*. [Uit dit onderzoek zijn door PPO DiagnostiekService monsters genomen en verder verwerkt. Alle positieve isolaties van *Phytophthora* zijn voor karakterisering opgestuurd naar de Nvwa.]
2. DNA-diagnose uitvoeren.
3. gebruik maken van een *Phytophthora* kit, (bv. Primediagnosics) waarmee snel te zien is of *Phytophthora* aanwezig is. Er is wel kruisreactie van enkele *Pythium*-soorten mogelijk.

4.2.3 Uitvoering in de praktijk

Rhododendronbladeren werden uitgehangen waar het water voor fertigatie/beregening uitgedompt wordt, waarbij:

- bijvoorbeeld op een plek met weinig of beperkte stroming (bijvoorbeeld net achter de korf voor het aanzuigen van water),

- en de bait dicht onder het wateroppervlak houden. Hier zitten bij besmetting de meeste sporen aanwezig (figuur 7).

Na 3 dagen zijn de bladeren uit het water gehaald. In vochtig papier gelegd, vervolgens in plastic zakje gedaan en opgestuurd naar het laboratorium. Na aankomst bij PPO DiagnostiekService zijn de blaadjes gewassen met steriel water en Tween en nagespoeld met steriel water. Daarna zijn uit waterig doorschoten plekjes en enkele bruine plekjes stukjes bladweefsel gesneden en uitgeplaat op petrischalen met PVPH. Na een aantal dagen is de uitgroei van schimmels beoordeeld. Het bleek dat uit het Rhodo-blad volop *Phytophthora* groeide. Een aantal isolaties is opgezuiverd en aangehouden in de collectie. Isolaten zijn voor soortbepaling opgestuurd naar de Nwva.



Figuren 4 a,b: *Phytophthora*-vruchtrot boven in de boom.



Figuren 5 a,b: beregeningspompen voor oppervlaktewater.



Figuren 6 a,b: typische sloten voor beregening met oppervlaktewater.



Figuur 7: plaatsen van bait (Rhododendron-bladeren) voor het vangen van sporen van *Phytophthora*.

4.3 Resultaten en discussie

In dit onderzoek zijn een aantal *Phytophthora*-soorten gevonden, waaronder *P. plurivora*, *P. 'Salixsoil'* en *P. inundata*. Op alle locaties werden wel één of meerdere *Phytophthora*-soorten in het oppervlaktewater gevonden. Dit ligt in de lijn van de voorspelling van vooraanstaande onderzoekers die al enige jaren laten zien dat de risico's op uitbreiding van onbekende *Phytophthora*'s ernstig toeneemt (Kuik, 2014). *P. cactorum* of *P. syringae* werden echter niet aangetroffen. Het herhalen van het onderzoek zou wenselijk zijn.

5 Discussie en conclusies

Phytophthora vruchtrot wordt voornamelijk veroorzaakt door *Phytophthora syringae* en *P. cactorum*, maar ook andere soorten kunnen voorkomen in Europa. *P. syringae* heeft in onder andere China een quarantaine status. *Phytophthora* is afhankelijk van vrij water tijdens verschillende kritische stadia van zijn levenscyclus, in het bijzonder voor de productie en verspreiding van zoösporen. *Phytophthora* kan ook via de beregeningsinstallatie worden verspreid, wanneer geïnfecteerd slotwater wordt gebruikt.

Phytophthora is een 'lastige' schimmel omdat de levenscyclus complex is. In de grond zijn rustsporen aanwezig (oösporen) die onder natte omstandigheden kiemen en daarbij ontstaan zwermsporen. Bij regen komen opspattende deeltjes op de vruchten terecht, waardoor de zwermsporen voor aantasting zorgen (*Phytophthora* vruchtrot). Na het afvallen en vergaan van aangetaste bladeren en vruchten komen de rustsporen vrij en zorgen voor een nieuwe besmetting van de grond. Op die manier neemt de besmetting in de loop van de jaren toe (de rustsporen kunnen jarenlang overleven. Voor de Nederlandse omstandigheden is nog niet bekend hoe en onder welke omstandigheden een infectie precies tot stand komt. En daarmee is het niet mogelijk om een goed advies te geven om infectie te voorkomen of te bestrijden. Een waarschuwingsmodel voor vruchtinfectie bij appel of peer is nog niet beschikbaar.

Het is aannemelijk dat *Phytophthora* zich via beregeningswater kan verspreiden over een boomgaard. Dit is waarschijnlijk de besmettingsroute van vruchtrot op een fruitperceel in het rivierengebied. In Nederlands onderzoek is ook al aangetoond dat in boomkwekerijgebieden het slotwater ook verontreinigd kan zijn met *Phytophthora*. Een goede methode om de aanwezigheid aan te tonen is het gebruik van een baittechniek, dus het 'vangen' van sporen van *Phytophthora* uit water. In dit onderzoek is een aantal *Phytophthora*-soorten in het oppervlaktewater gevonden, waaronder *P. plurivora*, *P. 'Salixsoil'* en *P. inundata*. Op alle locaties werden wel één of meerdere *Phytophthora*-soorten in het oppervlaktewater aangetroffen. Dit ligt in de lijn van de voorspelling van vooraanstaande onderzoekers die al enige jaren laten zien dat de risico's op uitbreiding van onbekende *Phytophthora*'s ernstig toeneemt. *P. cactorum* of *P. syringae* werden echter niet aangetroffen.

Door het diagnostiekcentrum van PPO-Lisse zijn voor de twee *Phytophthora*-soorten, *P. syringae* en *P. cactorum*, Taqman PCR's nu ontwikkeld en getoetst, met ondermeer natuurlijk besmette vruchten en sorteewater van fruitsorteerinstallaties. De resultaten van de Taqman-PCR werd vergeleken met de klassieke diagnostische toetsen. De Taqman PCR gaf steeds vergelijkbare resultaten. Ook werd de specificiteit getoetst met een groot aantal andere schimmelsoorten (waaronder Botrytis, schurft, en een aantal verwante *Phytophthora*-soorten). Ook hieruit bleek de Taqman goed te voldoen. De toetsen die in Lisse ontwikkeld zijn moeten nog een aantal van de validatiestappen doorlopen voordat ze als een routinetoets gebruikt kunnen worden.

Aanbevelingen:

- De 'bait'-methode kan bruikbaar zijn voor de praktijk om een perceel (boomgaard) te laten testen op aanwezigheid van *Phytophthora*. Er is meer onderzoek nodig om de methode praktijkrijp te maken.
- Met behulp van een snelle detectiemethode (bv Taqman PCR) is te bepalen of er inderdaad *Phytophthora* aanwezig is. Positieve monsters kunnen verder worden onderzocht om te bepalen om welke *Phytophthora*-soort het gaat. Taqman PCR kan ook gebruikt worden als van een kwantitatieve toets voor de bepaling aanwezigheid *Phytophthora* in de grond (inoculum potentieel). Hiermee kunnen risicopercelen beter geïdentificeerd worden.
- Verder onderzoek naar infectieroutes is wenselijk. Welke routes zijn het meest belangrijk: via bodem (opspattende gronddeeltjes) en/of beregeningswater.

- Effectiviteitsproeven met vruchten zonder verwonding waarbij infectie ontstaat zijn nog niet beschikbaar. Productie van zoösporen voor infectieproeven is nog steeds moeilijk. Kennis over een toetsmethode voor infectieproeven (en middelen testen) moet ontwikkeld worden.
- Met deze infectiemethode kunnen vervolgens experimenten uitgevoerd worden om voor- en naogst behandelingen te toetsen.

6 Literatuur

Anonymous, 2014. Procedures for assessment of risk of *Phytophthora* rot pre-harvest in UK.

<http://apples.hdc.org.uk/phytophthora-rot-additional.asp>

Bonants, P.J.M., Gent-Pelzer, van M.P.E., Hooftman, R., Cooke, D.E.L., Guy, D.C., Duncan, J.M., 2004. A combination of baiting and different PCR formats, including measurement of real-time quantitative fluorescence, for the detection of *Phytophthora fragariae* in strawberry plants. *European Journal of Plant Pathology* 110: 689–702.

Ceustermans, A., Creemers, P., 2012. *Phytophthora*, een bodemschimmel die ook vruchtrot kan veroorzaken bij appel en peer. *Fruittelnieuws* 16: 22-24.

Chandelier, A., Ivors, K., Garbelotto, M., Zini, J., Laurent, F., Cavelier, M., 2006. Validation of a real-time PCR method for the detection of *Phytophthora ramorum*. 2006 OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 36, 409–414.

Covey, R. P., Harris, D. C. 1990. *Phytophthora* fruit rots of pear and apple. Pages 30-31 in: A Compendium of Apple and Pear Diseases. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

Dobra, C., Sosa, M.C., Lutz, M.C., Rodriguez, G., Greslebin, A.G., Vélez, M.L., 2011. Fruit rot caused by *Phytophthora* sp. in cold-stored pears in the valley of Rio Negro and Neuquén, Argentina. Proc. 11th International Pear Symposium Eds.: E. Sánchez et al. Acta Hort. 909, ISHS 2011.

Elena, K., Paplomatas, E.J., 1999. Collar rot Caused by *Phytophthora citrophthora* on pear trees in Greece. *Phytoparasitica* 27 (4) : 291-298.

Ghimire, S.R., Richardson, P.A., Kong, P., Hu, J., Lea-Cox, J.D., Ross, D.S, Moorman, G.W., Hong, C., 2011. Distribution and diversity of *Phytophthora* species in nursery irrigation reservoir adopting water recycling system during winter months. *J. Phytopathol.* 159: 713–719.

Grove, G. G., Boal, R. J. 1991. Influence of temperature and wetness duration on infection of immature apple and pear fruit by *Phytophthora cactorum*. *Phytopathology* 81:1465-1471.

Harris, D.C., Xu, X.-M., 2003. Conditions for infection of apple by *Phytophthora syringae*. *J. Phytopathology* 151, 190–194.

Hayden, K., Ivors, K., Wilkinson, C., Garbelotto, M. 2006. TaqMan chemistry for *Phytophthora ramorum* detection and quantification, with a comparison of diagnostic methods. *Phytopathology* 96:846-854.

Kox, L., Heurneman, I., Vossenbergh van den, B., Beld van den, I., Bonants, P., Gruyter, H., 2007. Diagnostic values and utility of immunological, morphological and molecular methods for in planta detection of *Phytophthora ramorum*. *Phytopathology* 97: 1119-1129.

Kox, L., Roenhorst, J.W., 2004. Moleculair biologische technieken bij de Plantenziektenkundige Dienst. *Gewasbescherming* 35 (3): 176-181. Mededelingenblad van de Koninklijke Nederlandse Plantenziektenkundige Vereniging.

Kuik, van F., 2013. *Phytophthora*-problematiek - Inventarisatie van nieuwe *Phytophthora*-soorten in de teelt van boomkwekerijgewassen, in planten, grond en water. Rapport Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Wageningen UR, Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit, PPO nr. 3236137600/ PT nr. 14479.

Lindner, L., 2009. *Phytophthora cactorum* als Verursacher von Rinden- und Fruchtschäden am Apfel. Obstbau Weinbau 9: 312-315.

NFO & FrugiVenta, 2014. Perenteelt voor de Chinese markt.

[http://www.proku.nl/uploads/files/NFO%20Brochure%20Perenteelt%20voor%20Chinese%20markt%20DEF\(1\).pdf](http://www.proku.nl/uploads/files/NFO%20Brochure%20Perenteelt%20voor%20Chinese%20markt%20DEF(1).pdf)

Persen, U., Fickert, W., Altenburger, J., Gottsberger, R. A., 2014. Erstmals Lagerschäden durch *Phytophthora syringae* in Österreich. Besseres Obst 5/2014: 4-5.

Shang, X., Wang Z., Xu L., 2011. Occurrence and Control of Pear Blight Rot (*Phytophthora cactorum*) in Qianxian of Shaanxi Province. Plant Diseases and Pests 2011, 2(3) 17 -19.

Spotts, R. A., Grove, G. G., 2002. First report of *Phytophthora syringae* causing rot on apples in cold storage in the United States. Plant Disease 86 (6): 693.

Tomlinson, J.A., Boonham, N., Hughes, K.J.D., Griffin, R.L., Barker, I., 2005. On-site DNA extraction and Real-Time PCR for detection of *Phytophthora ramorum* in the field. Applied and environmental microbiology Nov. 2005: 6702–6710.

Ufer, T., Werres, S. K., Posner, M., Wessels, H.P., 2008. Filtration to eliminate *Phytophthora* spp. from recirculating water systems in commercial nurseries. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2008-0314-01-RS.

Vliegen-Verschure, A., 2010. Phytophthora, een lastige schimmel : de kletsnatte omstandigheden waren optimaal voor Phytophthora. De Fruitteelt 100 (47): 6-7.

Whiteside, J. O., Oswald, T. W., 1973. An unusual brown rot outbreak in a Florida citrus grove following sprinkler irrigation with *Phytophthora*-infested water. Plant Dis. Rep. 57:391-393.

Yamak, F., Peever, T. L., Grove, G. G., Boal, R. J., 2002. Occurrence and identification of *Phytophthora* spp. pathogenic to pear fruit in irrigation water in the Wenatchee River Valley of Washington State. Phytopathology 92:1210-1217.