



# De rol van oösporen in de epidemiologie van *Phytophthora infestans*

Eindrapportage in opdracht van het Masterplan Phytophthora

Periode: oktober 1999 tot en met oktober 2002

G.J.T. Kessel, W.G. Flier, H.T.A.M. Schepers & L.J. Turkensteen

Projectpersoneel:

Dr.Ir.ing. W.G. Flier	Projectleider
Dr.Ir. G.J.T. Kessel	Onderzoeker
Dr.Ir. L.J. Turkensteen	Onderzoeker
Ing. P.J. van Bekkum	Onderzoeksassistent
Ing. M.G. Förch	Onderzoeksassistent

Plant Research International B.V., Wageningen  
december 2002

Nota 216

© 2002 Wageningen, Plant Research International B.V.

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 Plant Research International B.V.

## **Plant Research International B.V.**

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen  
: Postbus 16, 6700 AA Wageningen  
Tel. : 0317 - 47 70 00  
Fax : 0317 - 41 80 94  
E-mail : [post@plant.wag-ur.nl](mailto:post@plant.wag-ur.nl)  
Internet : <http://www.plant.wageningen-ur.nl>

# Inhoudsopgave

	pagina
Samenvatting	1
Inleiding	3
Resultaten	5
1. Methodiekontwikkeling	5
2. Landelijke survey naar de formatie van oösporen in veldgewassen	7
3. Gewasresistentie en oösporenvorming	10
4. Remming van de productie van oösporen m.b.v. fungiciden en loofdodingsmiddelen	13
5. Kiemingsgedrag en infectiemomenten	16
Discussie	21
Literatuur	23
Bijlage I.	1 p.
Bijlage II.	2 pp.
Bijlage III.	2 pp.
Bijlage IV.	1 p.



## Samenvatting

Oösporen van *Phytophthora infestans* worden gezien als de motor achter de toegenomen genetische variatie binnen de Nederlandse *P. infestans* populatie zoals die de afgelopen 15 jaar is waargenomen. Daarnaast vervullen oösporen een rol als overlevingsstructuur van *P. infestans* in de bodem waarmee het pathogeen over een extra bron van (primair) inoculum beschikt en voor overwintering dus niet meer volledig afhankelijk is van overlevend mycelium in knollen.

Binnen dit project zijn aspecten m.b.t. vóórkomen, vorming, detectie, kieming en bestrijding onderzocht. Het potentieel voor vorming van oösporen bleek binnen de Nederlandse *P. infestans* populatie ruimschoots aanwezig. Van de vier Nederlandse teeltregio's lijken de Veenkoloniën het meest te lijden te hebben (gehad) van *P. infestans* oösporen. Oösporen bleken eveneens een rol te kunnen spelen als bron van (vroeg) primair inoculum.

Een duidelijke relatie tussen het niveau van partiële loofresistentie van aardappelcultivars en ondersteuning van oösporenvorming werd niet gevonden ofschoon hier in de literatuur duidelijke aanwijzingen voor bestaan. Compatibiliteit, regionaal A1/A2 ratio en (natte) klimatologische factoren spelen, naast cultivar, een belangrijke rol m.b.t. hoeveel oösporen daadwerkelijk worden gevormd in een aangetast gewas. De relatie tussen loofresistentie en oösporenvorming is vooralsnog niet zwaarwegend genoeg om deze factor in overweging te nemen bij de keuze voor een bepaald cultivar.

Fungiciden bleken in staat oösporenvorming sterk te reduceren. Zelfs als, volgens gangbare normen, te laat werd gespoten op stevig aangetaste planten kan dit het aantal gevormde oösporen zeer drastisch verminderen. Bespuitingen met fungiciden als noodmaatregel in aangetaste gewassen, specifiek om oösporenvorming tegen te gaan, biedt dus perspectief.

Kieming van oösporen bleek, kwantitatief bezien, een moeilijk beschrijfbaar proces. Kieming verloopt i.h.a. zéér langzaam met een bevorderende invloed van hogere temperaturen [5 – 20°C]. Grondsoort en vochtgehalte van de bodem hebben eveneens een (marginale) invloed op de kiemsnelheid. Sporangia, het product van een gekiemde oöspore, bleken, onder gunstige omstandigheden, zeer lang (5 – 8 weken) in de bodem te kunnen overleven. Uitgaande van grote aantallen oösporen in de bodem lijken kieming en overleving van sporangia dus niet beperkend voor het ontstaan van infecties uit oösporen. Restricties op het zwemgedrag van zoösporen opgelegd door het watergehalte van de bodemmatrix lijken primair beperkend voor het ontstaan van oösporeninfecties.

Samenvattend kan gezegd worden dat *P. infestans* oösporen een nieuw, maar blijvend probleem tijdens de teelt van aardappelen in Nederland zijn geworden. Oösporen zijn echter zeker beheersbaar. Voorkomen is, zeker m.b.t. oösporen, véél beter dan genezen. Een goed uitgevoerde bestrijdingsstrategie is en blijft de beste garantie voor een schoon gewas waarin geen oösporen gevormd zullen worden. Het gedogen van aantasting en het niet adequaat vernietigen van aangetast plantmateriaal (in het gewas, op de afvalhoop of als opslag) zijn garanties voor toekomstige problemen met oösporen in de bodem.

Als de aantasting van een gewas toch uit de hand gelopen is kan overwogen worden fungiciden toe te passen speciaal gericht op het voorkomen van het ontstaan van grote hoeveelheden oösporen in het gewas. Oösporen in de bodem kunnen alleen worden tegengegaan d.m.v. een voldoende brede, opslagvrije, rotatie van 1 op 4 of (liever) nog breder.



# Inleiding

Problemen in de Nederlandse aardappelteelt veroorzaakt door *P. infestans* zijn zodanig toegenomen dat ze een serieuze bedreiging vormen voor het voortbestaan van de Nederlandse aardappelteelt. Een groot deel van de extra problemen kan verklaard worden uit de toegenomen agressiviteit van de Nederlandse *P. infestans* populatie. Dit uit zich o.a. in een sterk gereduceerde latente periode waardoor de afzonderlijke cycli elkaar tijdens een epidemie steeds sneller zijn gaan opvolgen. Een verklaring voor de toegenomen agressiviteit wordt gevonden in de aanwezigheid van een functionele sexuele cyclus die ná de hernieuwde introductie van *P. infestans* in Nederland variatie in agressiviteit en virulentie, middels oösporen, in stand houdt en versterkt. Natuurlijke selectie bepaalt vervolgens dat tijdens het groeiseizoen steeds de meest agressieve *P. infestans* isolaten zullen prevaleren. Naast hun rol in de toegenomen agressiviteit van de *P. infestans* populatie vormen oösporen een nog relatief onbegrepen inoculumbron m.b.t. vroege (primaire) infecties. Oösporen worden in de plant gevormd na contact tussen het A1 en A2 mating type van *P. infestans*.

De populatiebiologie van oösporen en hun rol in de epidemiologie van de aardappelziekte is allerminst begrepen. Er bestaan grote hiaten in de kennis m.b.t. de vorming van oösporen in veldgewassen en de omstandigheden waaronder oösporen kiemen en infecties veroorzaken. Onze huidige kennis m.b.t. preventieve en curatieve maatregelen was onvoldoende om het oösporenprobleem te beheersen.

Het onderhavige project heeft kennis voortgebracht m.b.t. de rol van oösporen in de epidemiologie van de aardappelziekte. Het project is uitgevoerd onder de paraplu van het Masterplan Phytophthora. Vier onderzoeksmodules werden onderscheiden:

1. Landelijke survey naar de formatie van oösporen in veldgewassen (PPO en Plant Research International, voltooid in 2000).
2. Kwantificeren van de relatie tussen gewasresistentie en oösporenvorming (Plant Research International).
3. Remming van de productie van oösporen m.b.v. fungiciden en loofdodingsmiddelen (Plant Research International en PPO).
4. Kiemingsgedrag en infectiemomenten van oösporen (Plant Research International).

Daarnaast bleek het noodzakelijk het onderzoeksinstrumentarium uit te breiden met technieken waarmee *P. infestans* oösporen aangetoond konden worden in grond en gekwantificeerd konden worden in plantmateriaal.

Voor de opzet van dit rapport is gekozen resultaten van de hele projectperiode weer te geven. Voor een volledig overzicht zijn reeds gerapporteerde resultaten uit de periode 1999 tot en met 2001 gecompliceerd met resultaten uit het laatste jaar (oktober 2001 – 2002).





# Resultaten

## 1. Methodiekontwikkeling

*P. infestans* oösporen (Figuur 1) worden gevormd in het weefsel van de aardappelplant, veelal het blad. Na afsterven komt geïnfecteerd blad op de grond terecht waar, na afbraak, de oösporen in de bodem terechtkomen. Onder Nederlandse omstandigheden overleven oösporen in de bodem minimaal 3 - 4 jaar (Turkensteen *et al.*, 2000). Gedurende deze periode kunnen ze veldgewassen of opslag planten infecteren.

Binnen dit project zijn 3 methoden ontwikkeld om *P. infestans* oösporen aan te tonen en te kwantificeren in grond(monsters) en plantmateriaal.

### Extractie van oösporen uit aardappelblad

Oösporen worden gekwantificeerd per gewichts- of oppervlakte-eenheid plantmateriaal. Plantmateriaal wordt in ijs gemalen m.b.v. een Ultra Turrax staafmixer bij 24.000 rpm waarna het monster een ultrasoon behandeling ondergaat om klontering van bladstukjes op te heffen. De enzymen cellulase en macerozym worden toegevoegd om het plantweefsel af te breken. Na enzymdegradatie overnacht wordt het monster op een set zeven van 75 en 20  $\mu\text{m}$  gewassen (oösporen hebben een diameter van  $\pm 40 \mu\text{m}$ ). Oösporen blijven achter op de 20  $\mu\text{m}$  zeef. Dit debris wordt overgebracht in een vast volume water (5 ml) waarna de oösporenconcentratie bepaald wordt m.b.v. een Fuchs-Rosenthal telkamer. De extractieprocedure heeft een recovery van ongeveer 90%. De detectiegrens is vervolgens afhankelijk van de hoeveelheid pellet in het 5 ml eindmonster, de telkamer en het getelde volume. In het algemeen worden flinke aantallen oösporen teruggevonden. Deze methode is gebruikt om oösporen te extraheren uit geïnfecteerd blad van verschillende cultivars en uit blad behandeld met verschillende fungiciden en loofdodingsmiddelen.



Figuur 1. Vitale *P. infestans* oöspore gekleurd met tetrazoliumbromide. Duidelijk zichtbaar is de drievoudige wand van de oöspore.

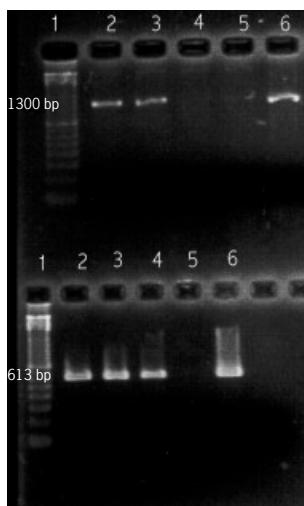
Foto: M.G. Förch & G.J.T. Kessel, Plant Research International.

## Extractie van oösporen uit grond

Oösporen worden gekwantificeerd per gewichtseenheid grond. Grondmonsters worden aan de lucht gedroogd en gezeefd over een 1mm zeef. Tien gram grond wordt vervolgens gesuspenderd in 70 ml water waarna het monster een ultrasoon behandeling ondergaat om klontering tegen te gaan. Na centrifugeren wordt het pellet overgebracht in een 80% sucrose oplossing waarna opnieuw wordt gecentrifugeerd. Het supernatant met de oösporen wordt vervolgens gewassen op de zevenset van 75 en 20  $\mu\text{m}$ . De oösporen blijven wederom achter op de 20  $\mu\text{m}$  zeef en worden overgebracht in een vast volume en geteld m.b.v. de Fuchs-Rosenthal telkamer. Deze extractie geeft een recovery van  $\pm 60\%$ . Door de vele verdunningsstappen nodig om zoveel mogelijk grond kwijt te raken werd de detectiegrens berekend op 680 oösporen/gram grond. Ondanks de sucrose-stap blijft het daarom moeilijk om grond van oösporen te scheiden op een dusdanige manier dat de monsters microscopisch geteld kunnen worden.

## Detectie van oösporen in grond m.b.v. PCR

Deze methode is afkomstig van het Scottish Crop Research Institute (SCRI, Dr. David Cooke) in Dundee en nu operationeel bij Plant Research International. *P. infestans* DNA wordt specifiek aangetoond na extractie van DNA uit grond. Een en ander is gebaseerd op een methode voor extractie van DNA uit grond beschreven door Cullen *et al.* (2001) in combinatie met een *P. infestans* specifieke 'nested PCR'. Na 2 PCR stappen levert dit een DNA fragment van 613 bp. De detectiegrens ligt op 10 –20 oösporen per gram grond. In de eerste stap wordt een semi-specifiek fragment geamplificeerd van 1300 bp. In de 2e PCR stap wordt uit dit 1e fragment een *P. infestans* specifiek deelfragment geamplificeerd met een grootte van 613 bp. Duidelijk te zien is hoe deze 2-staps procedure de gevoeligheid van de toets ten goede komt (Figuur 2): laantjes 3 en 4 zijn afkomstig van respectievelijk 100 en 50 oösporen. Laantje 3 geeft al een positieve reactie na de eerste PCR stap terwijl dit voor laan 4 (50 oösporen) pas na de 2e PCR stap het geval is. Problematisch is dat DNA uit mycelium, sporangia en zoösporen ook wordt aangetoond (Figuur 2, laan 2). Om dit laatste te vermijden moeten de grondmonsters voor de bepaling 1 jaar worden bewaard. Gedurende deze periode worden mycelium en sporangia via natuurlijke weg afgebroken. Deze methode is o.a. gebruikt om oösporen aan te tonen in grondmonsters met 'oösporen-verdenking' afkomstig uit het MP Phytophthora project 'vroege determinatie van *P. infestans* haarden'.



Figuur 2. 'Geneste PCR' t.b.v. detectie van oösporen in grond. Bovenste helft gel geeft resultaat 1e PCR stap met een semi-specifiek fragment van 1300 bp. Onderste helft gel geeft resultaat na 2e PCR stap met een *P. infestans* specifiek PCR fragment van 613 bp. Laanindeling: 1) moleculaire merker (ladder), 2) grond met mycelium, 3) 100 oösporen/ gram grond, 4) 50 oösporen/gramgrond, 5) negatieve controle, 6) positieve controle. Foto: P.J. van Bekkum, Plant Research International.

## 2. Landelijke survey naar de formatie van oösporen in veldgewassen

### Conclusies

De potentie voor oösporenvorming is in Nederland ruimschoots aanwezig. Gunstige Nederlandse 'mating type ratio's en het tolereren van aantasting werkt oösporenvorming in de hand. Grondmonsters uit haarden met oösporenverdenking uit het MP haarden determinatieproject bleken vaak daadwerkelijk oösporen te bevatten.

In navolging van een survey naar de aanwezigheid van oösporen in aardappel gehouden in de Veenkoloniën in 1998 is in 2000 i.s.m. PPO - AGV een survey uitgevoerd in 4 regio's in Nederland:

1. Veenkoloniën,
2. Noordoostpolder & Flevoland,
3. Oost Brabant,
4. West Brabant & Zeeland.

Per regio werden 5 onbespoten velden (voornamelijk opslag) bemonsterd door 25 deelblaadjes met 2 of meer lesies te plukken (Figuur 3). Elk blaadje werd afzonderlijk op water agar geïncubeerd waarna aanwezigheid van oösporen microscopisch werd beoordeeld bij 100x vergroting. Op deze manier wordt het potentieel voor oösporenvorming geëvalueerd. In een aparte rondgang in bovengenoemde 4 gebieden werden, in samenhang met onderzoek voor DWK programma 337, *P. infestans* isolaten verzameld uit praktijkvelden. Van deze isolaten werd het mating type bepaald.

Grondmonsters met 'oösporenverdenking' afkomstig uit het Masterplan Phytophthora project 'haarden determinatie' zijn getoetst op aanwezigheid van *P. infestans* oösporen m.b.v. de PCR methode beschreven in de vorige paragraaf.

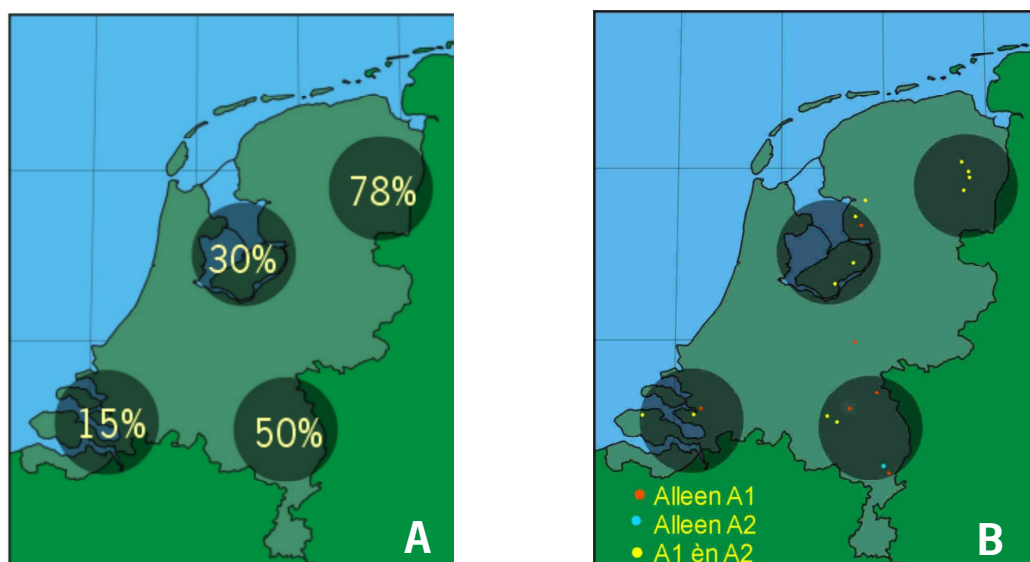


Figuur 3. Aardappelplant met bladeren met meer dan 1 lesie veroorzaakt door *P. infestans*.  
Foto: G.J.T. Kessel, Plant research International.

In de Veenkoloniën werden in 78% van deze blaadjes oösporen aangetroffen. In Oost Brabant in 50% van de blaadjes, in de Noordoostpolder & Flevoland in 30% en in West Brabant & Zeeland in 15% van de blaadjes (Figuur 4A). Als oösporen aangetroffen werden waren ze veelal in (zeer) grote aantallen in het blad aanwezig. Het gemiddeld aantal lesies op de bemonsterde bladeren bedroeg 6, 14, 2-3 en 2-3 voor respectievelijk de Veenkoloniën, Oost Brabant, Noordoostpolder & Flevoland en West Brabant en Zeeland.

In alle regio's werden in de 2e rondgang met regelmaat praktijkpercelen gevonden waarin zowel het A1 als het A2 mating type aanwezig waren (Figuur 4B).

Tabel 1 geeft de resultaten van de PCR oösporen detectie op de grondmonsters afkomstig uit het haardendeterminatieproject. In totaal zijn 7 grondmonsters genomen en in drievoud geanalyseerd. Concluderend kan gesteld worden dat de potentie voor oösporenvorming door *P. infestans* in heel Nederland ruimschoots aanwezig is. Tabel 1 laat zien dat oösporen daadwerkelijk een rol kunnen spelen als bron van inoculum, zelfs vroeg in het seizoen zoals in 2000. Bijna alle grondmonsters afkomstig uit verdachte haarden bleken positief voor oösporen. Daaruit kan geconcludeerd worden dat de aanwijzingen voor oösporeninfecties zoals die door de waarnemers gebruikt werden redelijk betrouwbaar zijn.



Figuur 4. A) Voorkomen van *P. infestans* oösporen in 4 aardappelteeltregio's in Nederland in bladeren met 2 of meer lesies na incubatie op water agar.  
B) Voorkomen van *P. infestans* A1 en A2 mating types in hetzelfde praktijkveld.

Tabel 1. Resultaten van de PCR analyse op grondmonsters met oösporenerdenking afkomstig uit het MP haardmeldingsproject.

Plaats	Datum	Type	Herkomst	Gewas	Voorvrucht	Oösporen aanwezig (PCR detectie)
Nieuwe Pekela	24 mei 2000	haard in voorheen een plas	L.J. Turkensteen	biet met aardappelopslag (Seresta)	aardappel (Seresta)	ja
Zeeuws Vlaanderen	mei 2000	haard aan slootkant	DLV (P. Cammaert)	aardappel (Ukema)	bruine bonen en aardappel opslag	ja
Valthermond (Kompas)	2001	slootkant PPO proefveld	L.J. Turkensteen & P. van Baarlen	aardappelproefveld (Karakter)	aardappel (Karakter)	ja
Valthermond (Kompas)	2001	haard 2	L.J. Turkensteen & P. van Baarlen	aardappelproefveld (Karakter)	aardappel (Karakter)	nee
Valthermond (Kompas)	2001	haard 2	L.J. Turkensteen & P. van Baarlen	aardappelproefveld (Karakter)	aardappel (Karakter)	ja
Norg 1	3 juli 2001	haard	L.J. Turkensteen & P. van Baarlen	aardappel (Bintje)	?	ja
Norg 2	3 juli 2001	haard, 80 m verwijderd van haard Norg 1	L.J. Turkensteen & P. van Baarlen	aardappel (Bintje)	?	ja

### 3. Gewasresistentie en oösporenvorming

#### Conclusies

Rassen verschillen in de mate waarin zij oösporenvorming ondersteunen. De omstandigheden en de tijdsduur waaronder *P. infestans* aantasting in een gewas wordt getolereerd is echter eveneens zeer belangrijk. Problemen met oösporen ontstaan op velden waar, in voorgaande jaren, gedurende langere tijd voortschrijdende aantasting van het gewas door *P. infestans* gedoogd is. Korte rotaties werken het probleem in de hand.

Uit verkennend onderzoek is gebleken dat er een omgekeerd evenredig verband bestaat tussen het niveau van partiële resistentie van een ras en de oösporenproductie op dat ras door *P. infestans* (Turkensteen *et al.*, 2000). Dit wordt veroorzaakt doordat lesies op meer resistente rassen langzamer groeien waardoor meer tijd beschikbaar is voor vestiging van meer lesies op 1 blad. Hoe meer lesies per blad, hoe groter de kans dat A1 en A2 lesies aanwezig zijn. Contact tussen A1 en A2 mating type is een vereiste voor oösporenvorming.

Identificatie van aardappelrassen die oösporenvorming niet of slecht ondersteunen is het doel van de hierna beschreven experimenten.

Na de start van dit project is een screening uitgevoerd met een assortiment (A1 & A2) *P. infestans* isolaten waarbij, binnen dit assortiment, alle mogelijke A1 x A2 kruisingen zijn beoordeeld op hun vermogen oösporen te vormen. Kruising van de Nederlandse isolaten IPO98014 (A1) en IPO82001 (A2) bleek consistent de meeste oösporen op te leveren waarop deze combinatie geselecteerd is voor gebruik in de experimenten. Later is het A2 isolaat IPO82001 vervangen door het Nederlandse A2 isolaat IPO655-2A of het Mexicaanse A2 isolaat Pic96002 omdat de oösporenproductie van deze kruisingen aanmerkelijk betrouwbaarder bleek.



Figuur 5. Overzicht over de miniplots (1 rij, 5 m lang) van 11 verschillende rassen t.b.v. toetsen oösporenproductie in verschillende rassen in het veld.

Foto: G.J.T. Kessel, Plant Research International.

In een tweetal experimenten is oösporenvorming in een beperkt assortiment rassen (aanvullend op Turkensteen *et al.*, 2000) onderzocht. In een eerste experiment werden van 8 rassen in een veldgewas 12 niet geïnfecteerde volgroeide deelbladeren gemonsterd. Deze bladeren werden afzonderlijk op water agar gelegd en geïnoculeerd met A1 (IPO98014) en A2 (IPO82001). Na 3 weken incubatie bij 10°C werden de oösporen geëxtraheerd volgens de eerder beschreven methode en gekwantificeerd. In het tweede (veld) experiment zijn 11 rassen (alle 8 uit experiment 1 + 3 extra rassen) in miniplotjes in het veld geïnoculeerd (Figuur 5) met A1 (IPO98014) en A2 (IPO82001). Nadat de aantasting een niveau bereikt had van gemiddeld 40% werden per ras 20 deelbladeren bemonsterd met 2 of meer lesies. Deze bladeren werden afzonderlijk op water agar geïncubeerd bij 10°C gedurende 3 weken. Daarna zijn oösporen uit het blad geëxtraheerd en gekwantificeerd. De resultaten staan vermeld in Tabel 2.

In 2001 is vervolgens een screening uitgevoerd met de internationale standaardset R1 tm R11 (is geschiktheid m.b.t. oösporenvorming gekoppeld aan R-genen) en de rassen die in het NILB project als referentieset gebruikt worden, in totaal 28 rassen. Deze screening is 2x uitgevoerd. In beide experimenten bleken echter in het geheel geen oösporen gevormd te zijn, ook niet in de positieve controles. De vermoedelijke oorzaak is een achterblijvende infectie door het A2 isolaat IPO82001. Omdat het A1 isolaat (IPO98014) wel pathogeen en agressief was bleef er vermoedelijk niet voldoende tijd voor IPO82001 om weefsel te koloniseren. Er resteert dan in essentie een monocultuur van IPO98014 waarin geen oösporen gevormd kunnen worden.

In 2002 zijn, zoals afgesproken met de begeleidingscommissie, geen verdere experimenten naar de relatie tussen gewasresistentie en oösporenvorming meer uitgevoerd.

Uit de resultaten blijkt dat onder ideale (laboratorium)omstandigheden in blad van de rassen uit het huidige assortiment ruimschoots oösporen gevormd worden. Bintje lijkt onder laboratorium omstandigheden weinig oösporen te geven maar uit de resultaten behaald onder veldomstandigheden blijkt het omgekeerde. Turkensteen *et al.*, (2000) vonden ook hoge aantallen oösporen gevormd in Bintje blad. Hoogstwaarschijnlijk is onder laboratorium omstandigheden het blad te snel dood voor het optreden van oösporenvorming.

Met een set andere rassen vonden Turkensteen *et al.*, wèl grote verschillen m.b.t. oösporenvorming tussen de rassen. Pimpernel was, als enige ras, zowel in de huidige toetsen als de toetsen van Turkensteen *et al.*, opgenomen en ondersteunde in beide gevallen ruimschoots oösporenvorming.

Tabel 2. *Het gemiddeld aantal oösporen / cm<sup>2</sup> geproduceerd na inoculatie in laboratorium of veld met P. infestans isolaten IPO98014 (A1) en IPO82001 (A2). De standaardafwijking van het gemiddelde wordt gegeven tussen haakjes.*

Ras	Na lab-inoculatie oösporen/cm <sup>2</sup> blad	Na veld-inoculatie oösporen/cm <sup>2</sup> blad
Agria	220 (49)	22 (34)
Aziza	262 (51)	87 (63)
Bintje	3 (6)	274 (374)
Doré	nd (nd)	5 (9)
Eigenheimer	nd (nd)	22 (19)
Escort	nd (nd)	405 (442)
Innovator	354 (329)	719 (449)
Pimpernel	103 (72)	0 (0)
Remarka	484 (95)	5 (10)
Santé	419 (215)	411 (209)
Troll	327 (194)	0 (0)

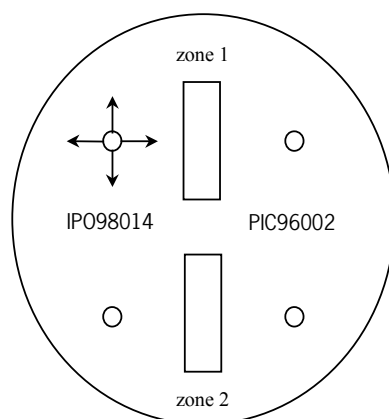
Geconcludeerd kan worden dat de aardappelrassen uit de (huidige) experimenten ruimschoots oösporenvorming (in veld of lab) kunnen ondersteunen. De resultaten van Turkensteen *et al.* (2000) laten, met een grotendeels andere set rassen, echter grote verschillen zien tussen de rassen m.b.t. ondersteuning van oösporenvorming. Rassen die in beide series experimenten zijn opgenomen geven consistent veel oösporen. Er zijn dus verschillen tussen rassen m.b.t. ondersteuning van oösporenvorming. Minstens even belangrijk zijn echter de omstandigheden en de tijdsduur waaronder *P. infestans* aantasting in een gewas wordt getolereerd. Oösporenvorming is een relatief langzaam proces met een lage optimum temperatuur van ongeveer 10°C. Na aantasting duurt het een kleine week voordat oösporen daadwerkelijk gevormd gaan worden (Drenth, 1994) gedurende welke tijd nog van buitenaf ingegrepen kan worden. Serieuze problemen met oösporen ontstaan dus op velden waar, in voorgaande jaren, gedurende langere tijd voortschrijdende aantasting van het gewas door *P. infestans* gedoogd is. Een korte rotatie werkt het probleem vervolgens verder in de hand.



## 4. Remming van de productie van oösporen m.b.v. fungiciden en loofdodingsmiddelen

### Conclusies

Fungiciden zijn, veelal bij lage concentraties, in staat oösporenvorming tegen te gaan. Behandeling van een aangetast gewas, als noodmaatregel met als doel oösporenvorming tegen te gaan is perspectiefvol. Loofdodingsmiddelen lijken niet speciaal geschikt om oösporenvorming tegen te gaan.



*Figuur 6. Schematische weergave van een petrischaal in bovenaanzicht. Groeiende P. infestans kolonies zijn weergegeven door kleine rondjes. Na contact tussen het A1 en A2 isolaat worden oösporen gevormd. De oösporen dichtheid wordt bepaald in zone 1 en zone 2. In de agar bevinden zich de (sub) lethale concentraties fungiciden.*

Naast opties om oösporenproductie te voorkomen en /of te vertragen d.m.v. rassenkeuze is mogelijk ook een actieve bestrijding van oösporen(vorming) middels fungiciden een aantrekkelijke nood-optie voor de praktijk. Vooropgesteld moet echter worden dat een schoon gewas, en derhalve een correct uitgevoerde bestrijdingsstrategie tijdens het groeiseizoen, de beste garantie is tegen oösporenbesmetting van de bodem.

Onderzocht is of fungiciden naast activiteit tegen b.v. sporen of mycelium specifiek effect hebben op de vorming van oösporen (zowel in aantal als vitaliteit) in het laboratorium en in de plant. Experimenten zijn hoofdzakelijk uitgevoerd in 2000 en 2001. In 2002 zijn additionele in vitro experimenten uitgevoerd met nieuw geïntroduceerde fungiciden en loofdodingsmiddelen.

### In vitro experimenten

Om oösporenvorming o.i.v. fungiciden te kunnen bestuderen is gewerkt met sub-lethale doseringen. In een pilot experiment zijn doseringen bepaald waarbij myceliumgroei 0%, 30%, 70% en 100% geremd werd. Loofdodingsmiddelen zijn alleen in de praktijkdosering gebruikt. *P. infestans* isolaten IPO98014 en PIC96002 zijn vervolgens in petrischalen gekruist volgens de tekening van Figuur 6. Na 6 weken groei van de isolaten op het fungicidemedium zijn de oösporen dichtheden en de vitaliteit van de gevormde oösporen bepaald. De resultaten zijn weergegeven in Tabel 2. Middelen, gebruikte concentraties en gedetailleerde analyse-resultaten zijn weergegeven in Bijlage I en II.

In het algemeen reduceren alle fungiciden de aantallen gevormde (vitale) oösporen in vergelijking met de controle behandeling (nul concentratie). Tanos lijkt de enige echte uitzondering ofschoon dit middel, evenals de meeste andere middelen, niet in de praktijkdosering getoetst is. Voor metalaxyl bevattende

producten zijn er aanwijzingen dat bij toenemende concentratie zowel de aantallen gevormde oösporen als de vitaliteit van die sporen afnemen. Verder lijken vooral dimethomorph en cyazofamid zeer effectief in lage concentraties tegen oösporen. De getoetste loofdoingsmiddelen lijken niet actief tegen oösporenvorming door *P. infestans*. Door microbiële verontreinigingen aanwezig in het middel kon reglone helaas niet getest worden.

## Plant experimenten

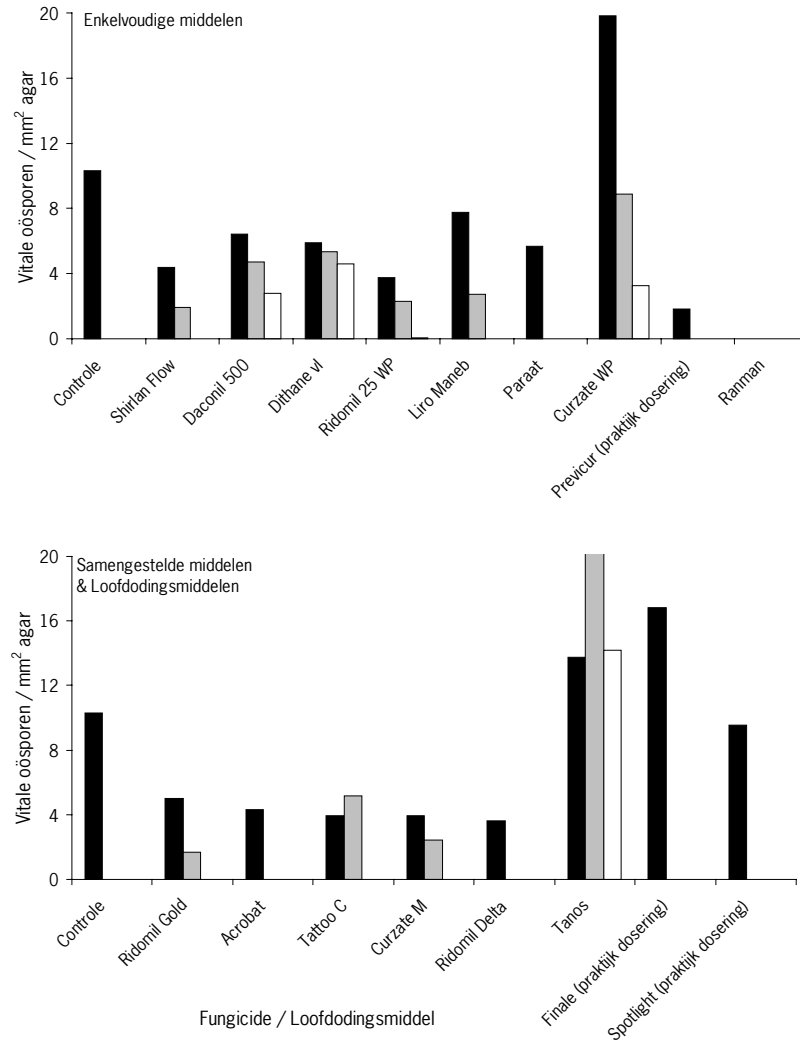
In 2000 en 2001 is i.s.m. PPO - AGV gekeken naar remming van oösporenvorming in planten. Aardappelplanten c.v. Bintje werden geïnoculeerd met *P. infestans* A1 + A2. Acht (!) dagen na inoculatie, als de symptomen al flink ontwikkeld zijn, zijn de planten bespoten met praktijkdoseringen fungiciden. Veertien dagen na inoculatie zijn per plant 10 deelbladeren geplukt welke 3 weken zijn geïncubeerd op water-agar bij 10°C waarna de oösporen zijn gekwantificeerd.

Resultaten zijn weergegeven in Tabel 3. Uit beide experiment blijkt dat alle fungiciden oösporenvorming significant reduceren. Tattoo C, Acrobat en Daconil 500 vlb remmen oösporenvorming het sterkst gevolgd door Mancozeb (Penncozeb), Shirlan en Ridomil Gold. Curzate M gaf de minste reductie van de aantallen gevormde oösporen maar was ook niet significant verschillend van Mancozeb en Ridomil Gold.

Tabel 3. *Effect van fungiciden op oösporenvorming door P. infestans in aardappelblad aan hele planten.*

Fungicide	Actieve stoffen	Dosering	Oösporen (cm <sup>-2</sup> )
Onbehandeld	-	-	171.6 (d <sup>1</sup> )
Acrobat	Dimethomorph & Mancozeb	2.0 kg/ha	0.4 (a)
Tattoo C	Propamocarb & Chloorthalonil	2.7 l/ha	0.6 (a)
Daconil 500 vlb	Chloorthalonil	3.5 l/ha	0.6 (a)
Penncozeb	Mancozeb	4.0 kg/ha	1.1 (ab)
Shirlan	Fluazinam	0.4 l/ha	5.8 (abc)
Ridomil Gold	Metalaxyl & Mancozeb	2.5 kg/ha	9.9 (bc)
Curzate M	Cymoxanil & Mancozeb	2.5 kg/ha	26.6 (c)

<sup>1)</sup> data gevolgd door dezelfde letter zijn niet significant verschillend in een LSD toets bij  $P = 0.05$



Figuur 7. Aantallen vitale oösporen gevormd in rogge-agar in aanwezigheid van sub-lethale doseringen van fungiciden en loofdodingsmiddelen. Middelconcentraties reduceren myceliumgroei met 0% (controle), 30% (zwart), 70% (grijs) en 100% (wit).

## 5. Kiemingsgedrag en infectiemomenten

### Conclusies

Kieming van oösporen is een extreem langzaam proces waarbij nooit grote percentages oösporen tegelijk zullen kiemen. Oösporenkieming wordt positief beïnvloedt door temperatuur [5 – 20°C]. Oösporen lijken beter te kiemen in veengrond en zilverzand dan in klei- en zandgrond. Oösporen kiemen ook, en waarschijnlijk beter, in niet water verzadigde bodems. Sporangia, het product van een kiemende oösporen, kunnen gedurende lange perioden (> 8 weken) in de bodem overleven.

Kiemgedrag van oösporen en infectiemomenten werden bestudeerd in het veld en laboratorium in relatie tot grondsoort, bodemvocht en temperatuur. Doel van de experimenten was om risico perioden m.b.t. infecties vanuit oösporen in de toekomst te kunnen voorspellen. Daarnaast is in het laatste jaar (2002) gekeken naar de overleving van sporangia (die immers gevormd worden door een gekiemde oöspore) in verschillende grondsoorten om inzicht te krijgen hoe lang risico op infectie bestaat nadat oösporen eenmaal gekiemd zijn.

### Veldexperiment

Een 2-jarig veldexperiment werd aangelegd in 2000 en 2001. Gekeken is naar de gevolgen voor een aardappelgewas van een bodembesmetting met *P. infestans* oösporen en naar de omstandigheden waaronder dit risico's oplevert (Figuur 8).



*Figuur 8. Een nat plot uit het veldexperiment in het 2e jaar (2001). Om natte praktijkomstandigheden te simuleren werd er 5x per dag water tussen de ruggen gepompt m.b.v. een gecomputeriseerd bevoeiingsysteem. Foto: G.J.T. Kessel, Plant Research International.*

Het eerste jaar is gebruikt om de bodembesmetting tot stand te brengen. In 2000 zijn 20 veldjes (9 x 9 m) aardappel c.v. Bintje aangelegd en geïnfecteerd met *P. infestans* A1 (isolaat IPO98014) of met *P. infestans* A1 + A2 (isolaten IPO98014 + IPO82001). A1 + A2 veldjes werden pas geïnoculeerd nadat alle A1 plots 100% waren aangetast. Dit om opbouw van A2, en dus kans op oösporenvorming, in de A1 veldjes te verhinderen. Doel was een oösporenpopulatie in de bodem op te bouwen in plots geïnoculeerd met A1 + A2. De plots geïnoculeerd met alleen A1 dienden als controle.

In het tweede jaar (2001) zijn op de exacte plaatsen van de veldjes uit 2000 wederom veldjes aardappel cv Bintje aangelegd. Om zeker te zijn van de aanwezigheid van oösporen in de bodem zijn in het voorjaar van 2001, direct voor het planten, additioneel oösporen op de A1 + A2 plots gebracht met een dichtheid van 600 oösporen/m<sup>2</sup>.

Omdat er duidelijke aanwijzingen zijn dat vrij water in de bodem een belangrijke rol speelt bij kieming van - en infectie door oösporen werd in 2001 de helft van de A1 en de helft van de A1 + A2 plots zeer nat gehouden door 5x per dag water tussen de ruggen te pompen (Figuur 8).

In 2001 werd vertrouwd op natuurlijke infectie, hetzij oösporen, geïnfecteerde poters of ingewaaid inoculum. Drie maal per week werd de hele veldproef minutieus doorzocht naar infecties door *P. infestans* (Figuur 9). In de periode eind juni tot eind juli 2001 zijn zo 50 *P. infestans* isolaten verzameld en opgeslagen in vloeibare stikstof. De verzamelde isolaten zijn vervolgens gekarakteriseerd m.b.v. AFLP om te bepalen of nakomelingen zijn van de kruising IPO98014 x IPO82001 wat in dit experiment geldt als bewijs voor infectie vanuit oösporen. Geïnfecteerde planten werden direct na het verzamelen van isolaten verwijderd om haarduitbreiding te voorkomen en de proef zo lang mogelijk in stand te houden.

*P. infestans* werd in dit experiment uitsluitend aangetroffen in natte (geïrrigeerde) plots. 39 isolaten waren afkomstig uit A1+A2 veldjes, 11 isolaten uit A1 veldjes. Na 20 juli kon geen onderscheid meer gemaakt worden tussen afzonderlijke haardjes waarna het verzamelen van isolaten is gestopt. Op grond van karakteristieke merkers in de AFLP bandenpatronen (Bijlage III, licht groen gemerkt) zijn isolaten Eng23, Eng30 en Eng38 de meest waarschijnlijke kandidaat nakomelingen van de ouders IPO98014 en IPO82001. Alle andere isolaten zijn zeer waarschijnlijk uit de omgeving afkomstig. Isolaten Eng23 en Eng38 zijn afkomstig uit plotjes die alleen met A1 geïnoculeerd zijn. Isolaat Eng30 is afkomstig uit een plotje wat met beide mating types geïnoculeerd is.

De opbrengst aan betrouwbare nakomelingen van beide geïntroduceerde ouders is helaas te laag om conclusies te kunnen trekken m.b.t. de omstandigheden waaronder oösporen aardappelgewassen kunnen infecteren. Duidelijk is wel dat natte omstandigheden in het algemeen zeer bevorderlijk zijn voor infectie van het gewas.



Figuur 9. Eerste haardje gevonden op 25 juni 2001 in een geïrrigeerd plot met een oösporenbesmetting in de bodem. Aantasting werd gevonden onder in het gewas.

Foto: G.J.T. Kessel, Plant Research International.

## Laboratorium, kieming van oösporen

In het laboratorium werd gekeken naar kieming en vitaliteit van oösporen o.i.v. grondsoort, vochtgehalte van de bodem en bodemtemperatuur. Het experiment is in tweevoud uitgevoerd. De proefopzet is vermeld in Bijlage IV. Drie grondsoorten, representatief voor de Nederlandse aardappelteeltgebieden, zijn opgenomen in de experimenten: klei, zand en veengrond.

Oösporen worden gemengd met een kleine hoeveelheid zilverzand (als drager, korrelgrootte  $> 70 \mu\text{m}$ ). Dit mengsel wordt verdeeld over gaaszakjes met een maasgrootte van  $15 \mu\text{m}$ . De zakjes met oösporen worden ingegraven in bakken met grond met verschillende vochtgehalten en/of temperaturen (Figuur 10). Gedurende 3 weken worden op verschillende tijdstippen zakjes uit de grond gehaald en wordt de inhoud voorzichtig uitgeplaat op water agar. Kieming en vitaliteit (tetrazoliumkleuring) van oösporen wordt bepaald aan het monster wat achterblijft op de  $20 \mu\text{m}$  zeef. Een oöspore werd als gekiemd beschouwd als er een kiembuis of een sporangium aanwezig was. Beide categorieën zijn apart geanalyseerd. Omdat de percentages kieming (volgens verwachting) erg laag bleven zijn de resultaten geanalyseerd m.b.v. een combinatie van IRREML en ANOVA.

Kieming van oösporen werd beïnvloed door grondsoort, temperatuur en tijd. Dit wordt verder uitgewerkt in Tabel 4. Vooropgesteld moet worden dat de percentages kieming die gevonden worden zeer laag zijn. Dit maakt het moeilijk experimenten te doen en resultaten verantwoord te interpreteren. Met de nodige armslag kan geconcludeerd worden dat oösporen 'beter' kiemen in veen en zilverzand dan in klei en zandgrond. Misschien kan beter gezegd worden dat oösporen nog slechter kiemen in zand- en kleigrond dan in veen en zilverzand.

Oösporen lijken beter te kiemen in niet volledig verzadigde gronden bij hogere temperaturen. Kieming bij  $5^\circ\text{C}$  bleef uit of gaat dermate langzaam dat dit niet binnen 3 weken waargenomen kan worden. Hoe hoger de temperatuur [ $10 - 20^\circ\text{C}$ ] en hoe langer de incubatieperiode des te meer oösporen daadwerkelijk zullen kiemen.

Vitaliteit van oösporen liep tijdens de proefperiode van 3 weken nauwelijks terug in elk van de vier grondsoorten. Wel werd een significant lagere vitaliteit gevonden onder natte (verzadigde) omstandigheden (58%) in vergelijking met grond op veldcapaciteit (67%).



*Figuur 10. Bekerglazen met zilverzand op veldcapaciteit (rechts) en zilverzand met vrij water (links). In beide objecten bevinden zich zakjes gemaakt van gaasstof met een  $15 \mu\text{m}$  maas (zoals op de voorgrond) met daarin oösporen.*

*Foto: G.J.T. Kessel, Plant Research International.*

Tabel 4. Gemiddelde percentages kieming van oösporen (sporangium) voor de significante hoofdeffecten uit beide experimenten.

Hoofdeffect	Kieming (% met sporangium)		LSD (P = 0.05)		
Grond	Klei	0.037 a	0.11		
	Zand	0.058 a			
	Zilverzand	0.098 a			
	Veen	0.111 a			
Temperatuur x vocht		Verzadigd	Veldcapaciteit	0.16	
	5°C	0.000 a	0.000 a		
	10°C	0.000 a	0.026 a		
	15°C	0.049 a	0.080 a		
	20°C	0.090 a	0.363 b		
Temperatuur x tijdstip		1 week	2 weken	3 weken	0.459
	5°C	0 a	0 a	0 a	
	10°C	0 a	0 a	0.039 a	
	15°C	0 a	0 a	0.193 ab	
	20°C	0 a	0.093 a	0.587 b	

Concluderend kan gesteld worden dat oösporen zeer langzaam kiemen onder gangbare omstandigheden qua grondsoort, bodemtemperatuur en bodemvocht. Opmerkelijk is dat oösporen m.b.t. kieming geen voorkeur hebben voor verzadigde gronden (plassen). Kieming in gronden op veldcapaciteit verloopt makkelijker. Infectie zal echter voornamelijk plaatsvinden door zoösporen welke weer vrij water nodig hebben om naar de aardappelplant te kunnen zwemmen.

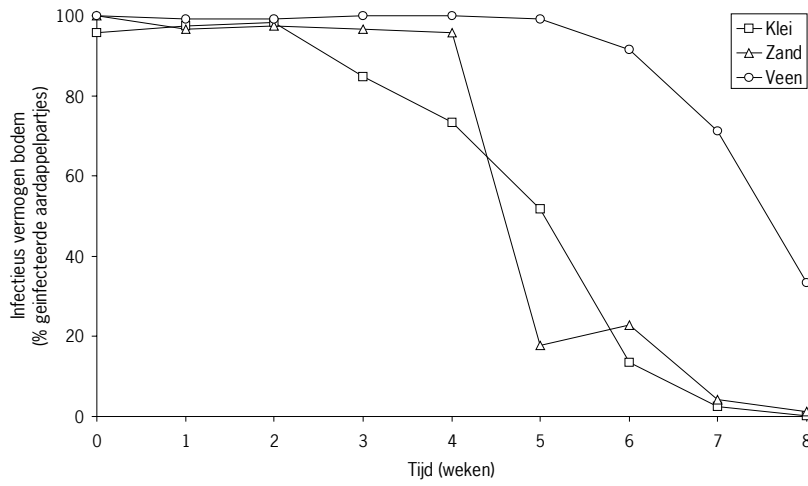
Op grond van deze resultaten is in overleg met de begeleidingscommissie besloten geen verdere experimenten te doen naar kieming van oösporen maar te concentreren op overleving van sporangia (het product van een kiemende oöspore) in de bodem o.i.v. grondsoort.

### Laboratorium: Overleving van sporangia

Het vochtgehalte van drie grondsoorten werd op veldcapaciteit gebracht en gemengd met sporangia van *P. infestans* tot een concentratie van 4000 sporangia/gram grond. Deze gronden werden geïncubeerd werden bij 15°C in het donker in een klimaatcel. Gedurende 8 weken werd wekelijks een monster genomen om het infectieus vermogen van de gronden te bepalen.

Een grondmonster van 0.2 (klei of zand) of 0.1 gram (veen) werd gemengd met water op een aardappelschijfje. Na 1 dag worden de schijfjes in 8 partjes gesneden welke na 8 dagen beoordeeld worden op aanwezigheid van *P. infestans*. Het aantal geïnfecteerde partjes is een maat voor het ziekteverwekkend vermogen van de grond. Dit experiment is 1x uitgevoerd. De resultaten zijn weergegeven in Figuur 11. Alle gronden behouden hun ziekteverwekkend vermogen gedurende lange tot zeer lange tijd.

Pas na 3 – 4 weken is sprake van enige afname in klei en zand. Veengrond blijft zeer infectieus gedurende 6 – 7 weken. Sporangieën in de bodem (uit b.v. gekiemde oösporen) kunnen dus gedurende langere tijd (dan verwacht) infecties veroorzaken.



Figuur 11. Verloop van het infectieus vermogen van 3 grondsoorten op veldcapaciteit na inoculatie op  $T = 0$  met 4000 *P. infestans* sporigia/gram grond.



## Discussie

### Detectie

Binnen dit project zijn methoden ontwikkeld om oösporen te kwantificeren in plantmateriaal en in grond. De techniek om oösporen uit blad te extraheren voldoet uitstekend en wordt ingezet in het onderzoek. De detectiegrens voor detectie van oösporen in grond ( $\pm 680$  oösporen/gram grond) was te hoog om bruikbaar te zijn in experimentele toepassingen en het voor routinematig screenen van grondmonsters op aanwezigheid van oösporen. De PCR techniek om oösporen in grond aan te tonen heeft een detectiegrens van 10 – 20 oösporen per gram grond. Voor experimentele doeleinden is deze techniek zeer bruikbaar. Voor praktijktoepassingen zoals het screenen van grondmonsters spelen echter factoren zoals de dichtheid en verdeling van oösporen in de bouwvoor en de gebruikte bemonsteringstechniek een belangrijke rol.

### Oösporen in de praktijk

De oösporensurvey van 2000 heeft aangetoond dat in alle onderzochte gebieden de potentie voor oösporenvorming ruimschoots aanwezig is. Grondmonsters uit haarden met oösporenverdenking bleken met zeer grote regelmaat daadwerkelijk oösporen te bevatten. Daarmee is aangetoond dat oösporen (vroeg in het seizoen) als bron van (primaïr) inoculum op kunnen treden. Gunstige klimatologische omstandigheden in de bodem blijven vereist voor infectie door zoösporen.

### Rasresistentie

Screening van aardappelrassen liet zien dat in alle betrokken rassen oösporen gevormd konden worden. Een eerdere screening (Turkensteen *et al.*, 2000) heeft, met een grotendeels andere set rassen, echter al laten zien dat er toch mogelijkheden zijn de kans op oösporenvorming door rassenkeuze te beperken. De omstandigheden en de tijdsduur waaronder *P. infestans* aantasting in een gewas wordt getolereerd in relatie tot de regionale A1/A2 ratio is echter eveneens zeer belangrijk. Problemen met oösporen ontstaan op velden waar, in voorgaande jaren, gedurende langere tijd voortschrijdende aantasting van het gewas door *P. infestans* gedoogd is. Korte rotaties werken het probleem in de hand.

### Fungiciden

Met betrekking tot de inzet van fungiciden tegen *P. infestans* oösporen moet voorop gesteld worden dat adequate bestrijding van *P. infestans* in het loof automatisch resulteert in 100% preventie van oösporenvorming. Opvallend was dat alle getoetste middelen een zeer aanzienlijke reductie van de aantallen gevormde oösporen in blad bewerkstelligden, ongeacht het karakter van het middel (protectant, curatief of eradicaief), zelfs als er 8 dagen na infectie werd gespoten (resultaten 2000). Metalaxyl, Cyazofamid en Dimethomorph zijn al bij lage concentraties zeer effectief tegen oösporenvorming. Voor verbetering van de waarschuwingssystemen m.b.t. het risico van oösporenvorming moet, zoals ook hierboven reeds gemeld, de relatie tussen het niveau van gewasaantasting en de kans op oösporen in kaart gebracht worden. Middels drempelwaarden kan dan bepaald worden wanneer er daadwerkelijk oösporen in het gewas gevormd worden waar dan de bestrijdingsadviezen op kunnen worden aangepast.

## Kieming en kiemgedrag

Kieming van oösporen is een extreem langzaam proces waarbij nooit grote percentages oösporen tegelijk zullen kiemen. Oösporenkieming wordt positief beïnvloedt door temperatuur [5 – 20°C]. Oösporen lijken beter te kiemen in veengrond en zilverzand dan in klei- en zandgrond. Oösporen kiemen ook, en waarschijnlijk beter, in niet water verzadigde bodems.

Sporangia, het product van een kiemende oösporen, kunnen gedurende lange perioden (> 8 weken) in de bodem overleven.

Het veldexperiment is in beide jaren goed verlopen maar AFLP analyse van de verzamelde isolaten bracht aan het licht dat het overgrote deel van de isolaten van buitenaf afkomstig is. Er zijn 3 isolaten geïsoleerd die mogelijk nakomelingen zijn van beide geïntroduceerde ouders en die dus duiden op infectie vanuit oösporen. Infectie door *P. infestans* werd uitsluitend gevonden in de geïrrigeerde plots wat eens te meer het belang van het (bodem)klimaat voor het epidemisch verloop van de aardappelziekte duidelijk maakt.

## Conclusie

Oösporen zijn in Nederland aanwezig maar het oösporenprobleem is beheersbaar. Het motto, ‘voorkomen is beter dan genezen’ m.b.t. *P. infestans* oösporen doet echter speciaal opgeld m.b.t. oösporen. Als oösporen eenmaal in de bodem belanden kan alleen vertrouwd worden op een voldoende lange rotatie, in volstrekte afwezigheid van de waard!! Voorkomen dat oösporen in de bodem belanden is de te prefereren optie. Voortschrijdende aantasting in gewassen en opslag moet worden voorkomen. In geval van nood kan met fungiciden ingegrepen worden, specifiek om vorming van oösporen te voorkomen. Korte rotaties dienen te worden vermeden.

## Literatuur

- Cullen, D.W., A.K. Lees, I.K. Toth & J.M. Duncan, 2001.  
Conventional PCR and real-time quantitative PCR detection of *Helminthosporium solani* in soil and on potato tubers. *European Journal of Plant Pathology* 107: 387 – 398.
- Drenth, A., E.M. Janssen & F. Govers, 1995.  
Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans* under natural conditions. *Plant Pathology* 44 (1) 86 – 94.
- Jiang, J. & D.C. Erwin, 1990.  
Morphology, plasmolysis and tetrazolium bromide stains as criteria for determining viability of *Phytophthora infestans*. *Mycologia* 82: 107 – 113.
- Turkensteen, L.J., W.G. Flier, R. Wanningen & A. Mulder, 2000.  
Production, survival and infectivity of oospores of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* 49: 688 – 696.



## Bijlage I.

Fungiciden en loofdodingsmiddelen getoetst in de in vitro experimenten m.b.t. hun effect op vorming en vitaliteit van *P. infestans* oösporen.

Middel	Werkzame stof	Gehalte	Concentratie ( $\mu\text{g/ml}$ ) werkzame stof bij 4 niveaus groeiremming				Praktijk-toepassing
			0%	30%	70%	100%	
Enkelvoudige middelen:							
Shirlan flow	Fluazinam	500 g/l	0	1	2.5	50	
Daconil 500	Chlorothalonil	500 g/l	0	0.2	0.3	1.5	
Dithane vl	Mancozeb	450 g/l	0	0.2	4	6	
Ridomil 25WP	Metalaxyl	25%	0	0.1	0.5	4	
Liro Maneb	Maneb	80%	0	2.5	10	50	
Paraat	Dimethomorph	50%	0	0.1	0.5	5	
Curzate WP	Cymoxanil	50%	0	0.02	0.15	2.6	
Previcur N	Propamocarb	722 g/l	0				25
Ranman	Cyazofamid	400 g/l	0	0.01	0.02	0.25	
Samengestelde middelen:							
Ridomil Gold	metalaxyl (4%) mancozeb (64%)	68%	0	0.5	1	10	
Acrobat	DMM (7.5%) Mancozeb (67%)	74.5%	0	1	2.5	10	
Tattoo C	Propamocarb Chloorthalonil	375 g/l 375 g/l	0	0.25	1	5	
Curzate M	Cymoxanil 4.5% Mancozeb 68%	72.5%	0	2	4	15	
Ridomil – Delta	metalaxyl (10%), maneb (27.6%), fentinacetaat (9.2%)	46.8%	0	0.25	4	10	
Tanos	Cymoxanil Famoxate	250 g/kg 250 g/kg	0	0.005	0.01	0.06	
Loofdodingsmiddelen:							
Reglone	Diquat	200 g/l	0				12 (0.6 kg/ha)
Spotlight	Carfentrazone-ethyl	240 g/l	0				1.2 (250 ml/ha)
Finale	Glufosinaat-ammonium	150 g/l	0				10 (3 l/ha)



## Bijlage II.

Resultaten van de regressie analyse m.b.t. het effect van sub-lethale pesticide doseringen op de vorming van oösporen door *P. infestans* uitgedrukt als de dichtheid en vitaliteit van de gevormde oösporen.

Middel	Concentratie*	Oösporen/cm <sup>2</sup>		Vitaliteit (%)	
Controle		24.5	b	42	b
Enkelvoudige middelen:					
Shirlan Flow	c1	21.8	a	20	a
Shirlan Flow	c2	2.2	a	88	a
Shirlan Flow	c3	0.0	a	0	a
Daconil 500	c1	23.0	a	28	b
Daconil 500	c2	22.5	a	21	a
Daconil 500	c3	19.7	a	14	a
Dithane vl	c1	22.6	a	26	a
Dithane vl	c2	23.3	a	23	a
Dithane vl	c3	20.9	a	22	a
Ridomil 25 WP	c1	13.9	a	27	b
Ridomil 25 WP	c2	13.4	a	17	a
Ridomil 25 WP	c3	0.91	a	6	a
Liro Maneb	c1	28.8	b	27	a
Liro Maneb	c2	16.1	a	17	a
Liro Maneb	c3	0.0	a	0	a
Paraat	c1	22.6	a	25	a
Paraat	c2	0.0	a	0	a
Paraat	c3	0.0	a	0	a
Curzate WP	c1	37.4	b	53	b
Curzate WP	c2	18.9	a	47	b
Curzate WP	c3	6.3	a	52	b
Previcur	praktijk	6.0	a	30	b
Ranman	c1	0.0	a	0	a
Ranman	c2	0.0	a	0	a
Ranman	c3	0.0	a	0	a

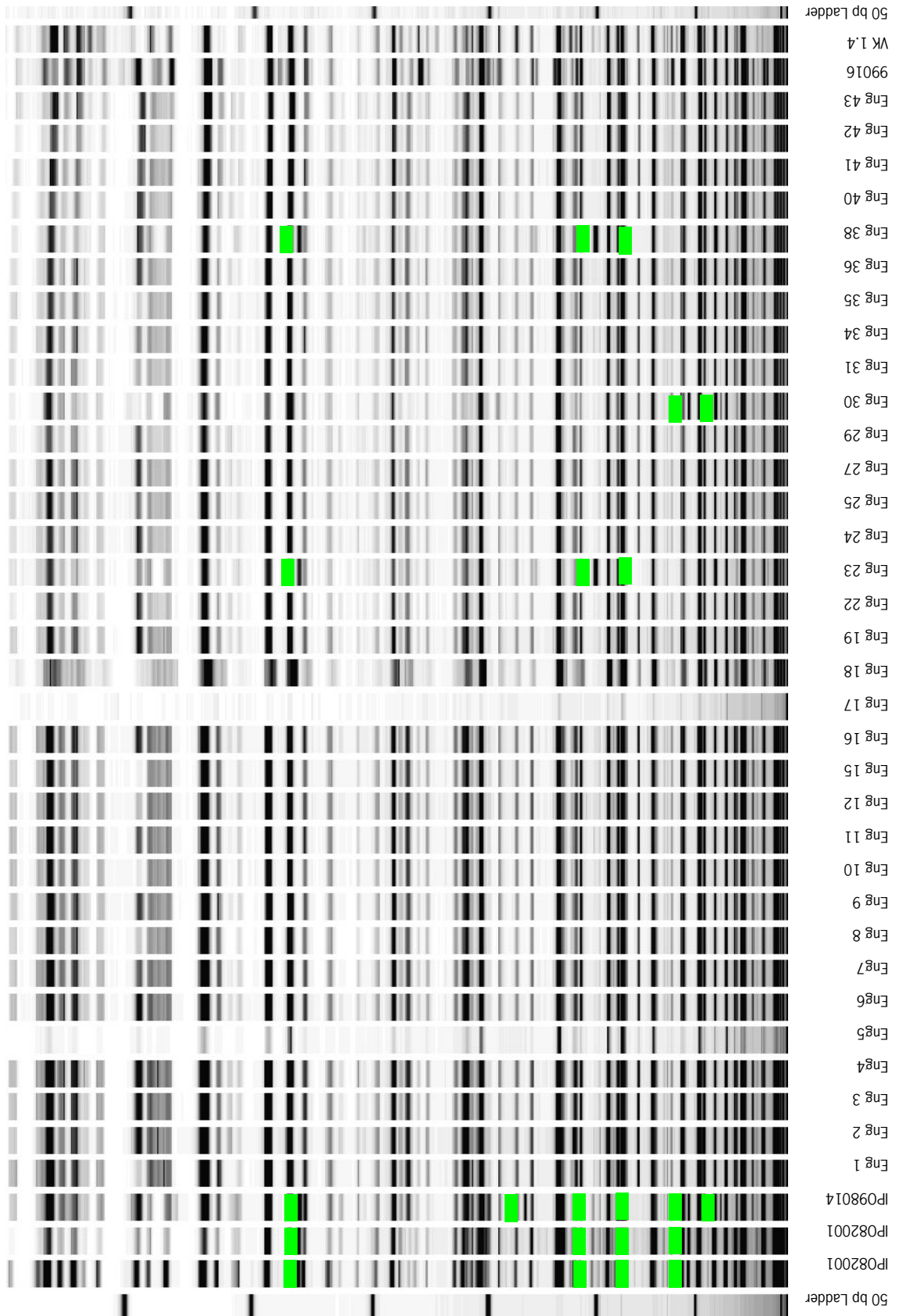
Middel	Concentratie*	Oösporen/cm <sup>2</sup>		Vitaliteit (%)
Samengestelde middelen:				
Ridomil Gold	c1	17.3	a	29 b
Ridomil Gold	c2	13.9	a	12 a
Ridomil Gold	c3	0.0	a	0 a
Acrobat	c1	18.7	a	23 a
Acrobat	c2	0.2	a	0 a
Acrobat	c3	0.0	a	0 a
Tattoo C	c1	20.6	a	19 a
Tattoo C	c2	22.4	a	23 a
Tattoo C	c3	0.0	a	0 a
Curzate M	c1	20.8	a	19 a
Curzate M	c2	17.5	a	14 a
Curzate M	c3	0.3	a	0 a
Ridomil Delta	c1	13.4	a	27 a
Ridomil Delta	c2	1.0	a	0 a
Ridomil Delta	c3	0.9	a	0 a
Tanos	c1	29.9	b	46 b
Tanos	c2	39.4	c	56 b
Tanos	c3	24.9	b	57 b
Loofdodingsmiddelen:				
Finale	praktijk	28.5	b	59 b
Spotlight	praktijk	21.7	a	44 b

\* concentraties c1, c2 en c3 geven respectievelijk 30, 70 en 100% groeiremming van mycelium gemiddelden gevolgd door dezelfde letter zijn niet significant verschillend



## **Bijlage III.**

AFLP analyse van *P. infestans* isolaten afkomstig van het oösporenveldexperiment aan de Eng in Wageningen in 2001.



## Bijlage IV.

Proefopzet en ingestelde vochtpercentages van de 4 grondsoorten bij twee vochtgehalten. Bij de verzadigde objecten staat een dun laagje water boven op de grond. De proef is uitgevoerd met 4 grondsoorten en bij 4 temperaturen (5, 10, 15 en 20°C). Oösporen zijn bemonsterd na 1, 2 en 3 weken incubatie waarna kieming is beoordeeld.

Experiment	Grondsoort	Grond per bakje (gram)	Vocht % (Pf 2)	Vocht % (verzadigd)	Toegevoegd water verzadigde grond (gram)
1	Klei	340	30	49	50
	Zand	380	14	29	50
	Veen	225	41	91	80
	Zilverzand	330	4	32	90
2	Klei	334	30	49	50
	Zand	340	14	31	50
	Veen	220	41	92	80
	Zilverzand	330	4	32	90

