

RESIPATH

Response of European Forests and Society to Invasive Pathogens

Contract - BR/132/A1/RESIPATH-BE

Samenvatting

In het RESIPATH project bestudeerden we hoe Europese bossen beïnvloed werden door en gereageerd hebben op invasieve schimmelpathogenen. Dit rapport focust op de bijdragen van de Belgische partners, die betrokken waren bij twee werkpakketten.

Het eerste werkpakket had betrekking op *Phytophthora* hybriden. We bestudeerden de prevalentie van *Phytophthora* hybriden in verschillende omgevingen (bossen, rivieren, kwekerijen) en over Europese klimatologische regio's. Hierbij onderzochten we de hypothese dat hun aanwezigheid en invasief karakter in dergelijke omgevingen aan het toenemen is, mede door de groeiende internationale handel in planten. Dergelijke planten kunnen latent besmet zijn en daardoor een route vormen voor de introductie van en kruising tussen *Phytophthora* soorten die vroeger geografisch gescheiden waren. Hybriden kunnen een verhoogde pathogeniteit en waardplantenspectrum verkrijgen door de combinatie van de genetische eigenschappen van hun ouders, wat kan leiden tot verhoogd invasief gedrag. De belangrijkste doelstelling van dit werkpakket was het ontwikkelen van gevoelige methodes om *Phytophthora* hybriden op te sporen en om deze methodes toe te passen op een collectie van isolaten uit verschillende omgevingen en klimatologische zones. We optimaliseerden en valideerden twee methodes, GBS (*Genotyping By Sequencing*) en flow cytometrie, op een collectie van 836 *Phytophthora* isolaten. De GBS techniek gaf een vooralsnog ongekeerde gevoeligheid en was kostenefficiënt. We identificeerden een aanzienlijk aantal isolaten als hybriden, in meerdere gevallen voor de eerste keer. We konden vaak ook bepalen welke isolaten van de ouderlijke soorten in onze databank verwant waren met de geobserveerde hybriden. In andere gevallen was het duidelijk dat één van de ouderlijke soorten nog niet beschreven was. De tweede techniek, flow cytometrie, hielp ons om allopolyploïde hybriden te identificeren en karakteriseren. Alhoewel de analyse van de gegevens nog niet afgerond is blijkt dat hybriden vooral voorkomen in specifieke clades en dat hybriden voornamelijk gevonden worden in het type omgeving waarin de isolaten van die clades endemisch zijn. Tot nog toe konden we onze hypothese over de hogere prevalentie van *Phytophthora* hybriden in kwekerijen niet weerhouden.

Het tweede werkpakket waarin de Belgische partners betrokken waren focuste op de vroege detectie van zich in de lucht verspreidende sporen van potentieel invasieve pathogenen voor bossen. Eerst maakten we gebruik van qPCR en geoptimaliseerde DNA extractietechnieken om drie sporenavalsystemen (filterpapier, de Burkard sporenval en een rotorod-achtige sporenval) te vergelijken op vlak van hun efficiëntie in het detecteren van drie voor bossen schadelijke schimmelpathogenen. Deze verschilden in sporendiameter en kwamen uit verschillende taxa. Daarna combineerden we de beste sporenval (rotorod-type) voor staalname in bossen met een NGS amplicon sequencing protocol en een nieuwe bioinformatica analyse pijplijn om detectie tot op species niveau uit te kunnen voeren. We valideerden het systeem eerst op een kunstmatig samengestelde gemeenschap van schimmels. Daarna pasten we dit protocol toe op DNA stalen bekomen uit opstellingen met rotorod vallen in verschillende bossen. We vergeleken de resultaten met deze bekomen via qPCR voor de drie schimmelsoorten die we eerder als testorganismen gebruikten. De NGS

techniek was minder gevoelig dan de qPCR methode maar liet toe om meerdere andere schimmels te detecteren, waaronder veroorzakers van boomziekten.

Onze bijdrage in beide werkpakketten verbeterde onze capaciteit om potentieel invasieve schimmelpathogenen te detecteren, wat ons moet toelaten om er sneller en doeltreffender tegen op te treden en daardoor zal helpen om hun impact te beperken.

Sleutelwoorden: flow cytometrie, genotypering via sequencer, hoge doorvoer sequencer, invasieve schimmelpathogenen, *Phytophthora* hybriden, sporenvangers