

Phytophthora infestans, een dynamische ziekteverwekker

Francine Govers

Laboratorium voor Fytopathologie, Wageningen University en Centre for BioSystems Genomics;
e-mail: francine.govers@wur.nl

In januari 2008 werd Francine Govers benoemd tot persoonlijk hoogleraar bij het Laboratorium voor Fytopathologie van Wageningen Universiteit. Op 11 juni 2009 sprak zij in de aula van deze universiteit haar inaugurele rede uit getiteld 'Dynamische ziekteverwekkers; wat we (willen) weten over oömyceten'. Hierin staan het weten en het willen weten symbool voor onderwijs en onderzoek, de twee peilers van een universiteit. Deze samenvatting van de oratie beschrijft de stand van zaken in het onderzoek aan oömyceten en in het bijzonder aan *Phytophthora infestans*, de veroorzaker van de aardappelziekte. De volledige tekst is beschikbaar in de digitale bibliotheek van Wageningen University (<http://edepot.wur.nl/15368>).

De Ierse hongersnood in de 19^{de} eeuw was het gevolg van een infectieziekte. *Phytophthora infestans* verwoestte in een rap tempo aardappelplanten in geheel West-Europa en dreef de Ieren op de vlucht. *Phytophthora* behoort tot de oömyceten, micro-organismen die ernstige ziektes veroorzaken in planten, dieren en mensen, en nauwelijks beheersbaar zijn. De enorme dynamiek van deze ziekteverwekkers vindt zijn oorsprong in het DNA. Grote, flexibele genfamilies zorgen voor snelle aanpassing aan nieuwe omstandigheden. Inzicht in deze dynamiek vormt de basis voor de ontwikkeling van rationele bestrijdingstrategieën.

Ruim 160 jaar na de Ierse hongersnood, vernietigt *Phytophthora* nog steeds miljoenen, zo niet miljarden, aardappelplanten wereldwijd en zaait, zo nu en dan, nog steeds sociale en politieke onrust. Ieder jaar opnieuw worden onze aardappels - onze nationale trots en een belangrijk exportproduct - bedreigd door de aardappelziekte en moet er veelvuldig worden gespoten met chemische middelen om de epidemie in te dammen. Dit is nadelig voor de aardappelteler en de economie en, volgens sommigen groeperingen, ook voor het milieu. Met de 'Ban-Bintjes-van-uw-Bord' actie begin jaren negentig bracht

Milieudefensie de gifpieper in de publieke belangstelling. Het goede imago van ons oer-Hollandse Bintje stond op het spel. Maar mogelijke oplossingen met een genetisch gemodificeerde aardappel als alternatief stuiten weer op Razende Rooiers en Ziedende Bintjes, die willens en wetens waardevolle proefvelden vernielen en zo de goedbedoelde inspanningen van wetenschappers frustreren. Genetische modificatie blijft voor politici een heet hangijzer.

Ziektebestrijding en resistentieveredeling

In de land- en tuinbouw is ziektebestrijding een integraal onderdeel van het productieproces. Zonder chemische bestrijding en de inzet van ziekeresistente rassen kan er gewoonweg niet genoeg voedsel geproduceerd worden om de snel groeiende wereldbevolking te voeden. Resistentieveredeling heeft als resultaat dat bestrijding van een aantal plantenziekten niet meer (volledig) afhankelijk is van chemische bestrijding. Er zijn echter ook voorbeelden waar resistentieveredeling niet of nauwelijks werkt. Een uitspraak van mijn naaste collega Prof. Pierre de Wit in zijn inaugurele rede in 1991 luidde: "Al is de veredelaar nog zo snel, het pathogeen achterhaalt hem wel". Veel aardappelverdelers hebben ervaren dat deze uitspraak zeker van toepassing is op *P. infestans*. Ettelijke pogingen om duurzame resistentie tegen de aardappelziekte uit wilde soorten in de cultuuraardappel in te kruisen zijn mislukt. De resistentie hield een paar jaar stand maar ging daarna weer verloren.

Wat willen we weten over oömyceten?

In ons onderzoek richten wij ons enerzijds op de vraag hoe *Phytophthora* er telkens weer in slaagt om de ingekruiste resistentie te omzeilen en anderzijds op het vinden van nieuwe aangrijpingspunten voor bestrijding van *Phytophthora*.

ARTIKEL

Hiervoor is basale kennis van de biologie en de biochemische en genetische eigenschappen van de ziekteverwekker zelf onontbeerlijk. We beperken ons daarbij niet tot die ene soort *P. infestans*, maar onderzoeken ook verwante soorten en maken gebruik van de kracht van vergelijkend onderzoek. Waarom infecteert *P. infestans* alleen aardappel en tomaat terwijl andere soorten op andere waardplanten gedijen? Deze zogenaamde gastheerspecificiteit moet opgesloten liggen in de genetische eigenschappen. Als we beschikken over de genetische blauwdruk, de DNA-volgorde van verschillende soorten, dan kunnen we een dergelijke vraag beantwoorden.

Oömyceten: dynamisch en divers

De schimmelachtige oömyceten hebben geen verwantschap met schimmels maar wel met bruine algen, zoals de gigantische slierten kelp die in grote hoeveelheden op het strand aanspoelen, met kiezeldiertjes die de oceaan bevolken, en met malariaparasieten (*Plasmodium* spp.) die hun niche hebben in onze rode bloedlichaampjes en veel dodelijke slachtoffers opeisen. Als groep zijn oömyceten enorm divers. Er zijn al zo'n 1000 soorten beschreven en waarschijnlijk zijn er nog minstens zoveel soorten die we nog niet kennen. Er zijn geslachten die alleen plantenpathogenen bevatten, zoals *Phytophthora* en de valse meeldauwen, waarvan *Bremia lactucae* op sla en *Plasmopara viticola* op druif bekende voorbeelden zijn. Dan zijn er geslachten met uitsluitend dierpathogenen zoals *Saprolegnia* die zalm aantast, en geslachten die zowel plantenpathogenen als dierpathogenen bevatten, bijvoorbeeld *Pythium* en *Aphanomyces*.

Het geslacht *Phytophthora*, de groep van 'plantvernietigers', is de laatste tien jaar enorm uitgebreid. Er zijn wel meer dan dertig nieuwe soorten beschreven die steeds nieuwe bedreigingen vormen. Daarbij zitten ook natuurlijke hybriden die ontstaan zijn door fusie tussen twee bestaande soorten en daardoor een breder of ander gastheerbereik hebben. Tussen de nieuwe soorten zitten opmerkelijk veel boompathogenen. Voorbeelden zijn *Phytophthora kernoviae* op beuk die sinds 2003 in Engeland in opmars is, en *Phytophthora ramorum*, de veroorzaker van 'Sudden Oak Death', een ziekte die zich voor het eerst manifesteerde in de jaren negentig aan de westkust van de Verenigde Staten. Dankzij de opkomst van *P. ramorum* heeft het *Phytophthora*-onderzoek een enorme impuls gekregen. De Californiërs zagen de grote indrukwekkende eiken die hun oprijlanen sieren verkommeren

en eisten van ons, wetenschappers, een kant en klare oplossing. Maar wat hadden wij te bieden? Eigenlijk bijzonder weinig! We konden alleen vaststellen dat het om een nieuwe soort ging en om een nieuwe ziekte die plots uit het niets opdoemde. Maar waarom deze soort nou zo happig was op eiken konden we niet verklaren.

De genetische blauwdruk van drie *Phytophthora*-soorten

Die impuls heeft ertoe geleid dat *P. ramorum* één van de oömyceten is waarvan de volledige DNA-volgorde op internet staat. Van drie *Phytophthora*-soorten is inmiddels de genomsequensie geanalyseerd en de genen zijn in kaart gebracht en beschreven in publicaties in *Nature* en *Science* (Haas *et al.*, 2009; Tyler *et al.*, 2006). De drie soorten verschillen in hun waardplantenreeks. *P. ramorum* heeft veel waardplanten, *Phytophthora sojae* slechts één, sojaboon, en *P. infestans* een beperkt aantal, aardappel, tomaat en nog enkele nachtschades. Van de drie soorten heeft *P. infestans* verreweg het grootste genoom, 240 Mb, dat wil zeggen 240 miljoen A-tjes, G-tjes, C-tjes of T-tjes, ten opzichte van 65 miljoen in *P. ramorum* en 95 miljoen in *P. sojae*. In vergelijking met het genoom van de mens zijn de *Phytophthora* genomen een stuk kleiner, maar in vergelijking met een echte schimmel, een bacterie of een virus zijn ze een stuk groter. Opmerkelijk is dat in de drie *Phytophthora*-soorten, ondanks de grote verschillen in genoomgrootte, het aantal genen min of meer vergelijkbaar is ($\pm 14.000 - 18.000$). Van deze genen zijn er zo'n 9500 nagenoeg hetzelfde in alle drie. Dit zijn grotendeels zogenaamde huishoudgenen die standaard nodig zijn om een levende cel te laten functioneren. Maar waarom is het *P. infestans*-genoom dan toch zoveel groter? Dat komt omdat het percentage repeterende DNA sequenties in *P. infestans* veel hoger is. Maar liefst 74 % van het genoom bestaat uit deze zogenaamde 'repeats' tegenover 28% in *P. ramorum* en 35% in *P. sojae* (Haas *et al.*, 2009). Deze 'repeats' zijn veelal dynamische DNA elementen die zichzelf vermenigvuldigen tot wel meer dan duizend kopieën. Ze kunnen springen in het genoom van de ene plek naar de andere, en zo ook genen mee laten liften die dan ook op die andere plek terecht komen en een andere functie kunnen krijgen.

Effectoren

Omdat we speciaal geïnteresseerd zijn in gastheerspecificiteit hebben we ook gekeken naar

de verschillen tussen soorten, dus naar de genen die uniek zijn in één soort. *P. infestans* heeft bijna 6000 genen die niet in de andere twee soorten voorkomen en tussen deze 6000 zitten nogal wat genen die coderen voor eiwitten die uitgescheiden worden. Een ziekteverwekker moet eiwitten uitscheiden om zijn gastheer te kunnen aanvalen. Dat kunnen enzymen zijn die celwanden en celmembranen afbreken waardoor de weg vrij gemaakt wordt om de gastheercellen binnen te dringen. Dat kunnen ook gifstoffen zijn waarmee de cellen van de gastheer gedood worden of het kunnen eiwitten zijn die de natuurlijke afweer in de plant onderdrukken. *Phytophthora* beschikt over zo'n 1500 tot 2000 genen die coderen voor eiwitten die uitgescheiden worden. Hierin zit een subgroep die onze speciale belangstelling heeft, de zogenaamde RXLR-effectoren. Effectoren, het woord zegt het al, zijn eiwitten die een effect hebben op de gastheer. *P. infestans* beschikt over een enorme familie van RXLR-effectoren die bovendien een grote diversiteit vertoont: meer dan 560 effectoren die afgezien van een RXLR-motief weinig gemeen hebben. RXLR verwijst naar een motief dat bestaat uit de aminozuren R voor arginine, X voor elk willekeurig aminozuur, L voor leucine en nogmaals een R. Dit motief fungeert als het ware als de postcode die de eindbestemming van het eiwit aangeeft. Die eindbestemming is de binnenkant van de plantencel (Govers & Bouwmeester, 2008). Recent is voor enkele RXLR-effectoren aangetoond dat ze afweer in de gastheer kunnen onderdrukken om zo de weg vrij te maken voor infectie. *Phytophthora* kan dan ongestoord zijn gang gaan, voedingsstoffen opnemen, sporuleren en zorgen voor nageslacht.

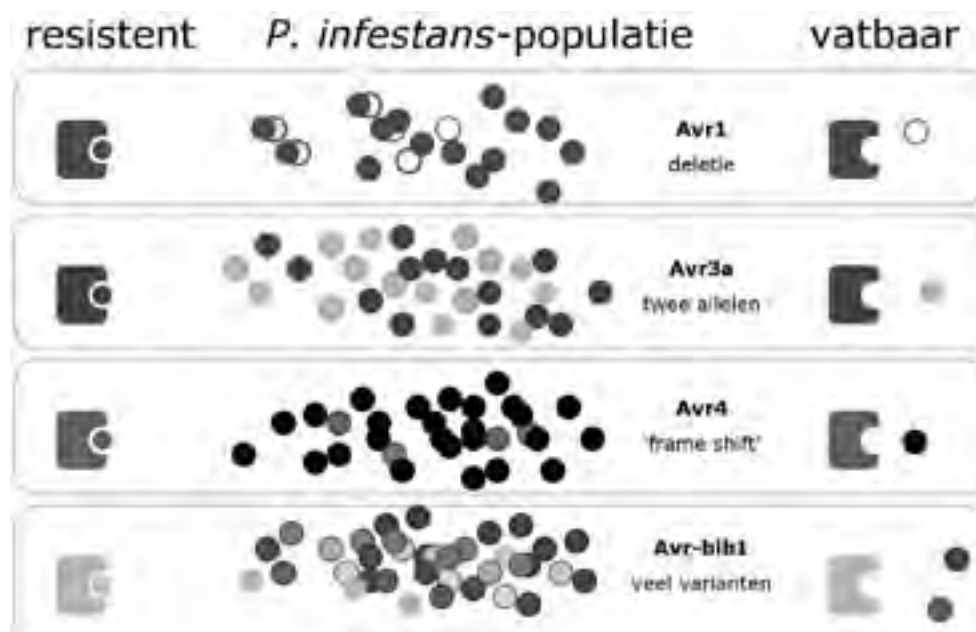
Malaria-parasieten (*Plasmodium* spp.) hebben ook effectoren die ze naar de binnenkant van de rode bloedcel kunnen sturen om de gastheer te manipuleren. De postcode is net iets anders maar lijkt erg veel op RXLR en de motieven zijn functioneel uitwisselbaar. Aangezien *Plasmodium* in de 'tree-of-life' in dezelfde grote tak zit als oömyceten rijst de vraag of het een mechanisme betreft dat in de gemeenschappelijke voorouders van oömyceten en *Plasmodium* aanwezig is of dat het misschien een vorm is van convergente evolutie die plantenpathogenen en humaanpathogenen onafhankelijk van elkaar hebben verworven.

De meeste RXLR-effectoren lijken een gemeenschappelijke oorsprong te hebben: een oer-RXLR-effector in een hypothetische voorouder van *Phytophthora*. Door voortdurende duplicatie van RXLR-genen gevolgd door mutaties zijn heel veel verschillende RXLR-effectoren ontstaan.

Iedere *Phytophthora*-soort heeft zijn eigen grote familie van dynamische RXLR-effectoren waarin voortdurend veranderingen optreden (Jiang *et al.*, 2008). Dit is volgens de theorie van Darwin een voorbeeld van natuurlijke selectie: via stapsgewijze veranderingen kan de ziekteverwekker zich voortdurend aanpassen aan zijn omgeving. Dat deze selectie optreedt in RXLR-genen maar niet in bijvoorbeeld de huishoudgenen die alle soorten gemeen hebben, komt omdat de RXLR-genen de gastheerspecificiteit bepalen. Hier ligt het antwoord op de vraag hoe *Phytophthora* er telkens weer in slaagt om de resistentie, die via veredeling uit wilde soorten in de cultuuraardappel is ingekruist, te omzeilen. In een natuurlijk evenwicht zal een plant zich wapenen tegen een ziekteverwekker door juist deze effectoren, die de natuurlijke afweer onderdrukken, te blokkeren. Want ook in de plant treedt selectie op en 'survival of the fittest' veroorzaakt een voortdurende wapenwedloop tussen plant en ziekteverwekker.

Wapenwedloop

De wapens van de plant zijn de resistentiegenen (*R*-genen). Planten beschikken over een groot arsenaal aan *R*-genen die de plant helpen om weerstand te bieden tegen allerlei ziekteverwekkers. Ieder resistentie-eiwit (*R*-eiwit) heeft zijn eigen specificiteit, dat wil zeggen dat één *R*-eiwit specifiek één soort virus of één soort schimmel blokkeert. Meestal gaat de specificiteit nog verder; een *R*-eiwit blokkeert dan slechts één stam van de ziekteverwekker en laat een andere stam ongehinderd zijn gang gaan. Veel wilde aardappelsoorten die groeien in Zuid- en Midden-Amerika zijn resistent tegen de aardappelziekte en beschikken dus over *R*-eiwitten die *P. infestans* kunnen blokkeren. De betreffende *R*-genen zouden we kunnen benutten om onze favoriete aardappelcultivars resistent te maken tegen de aardappelziekte en daarom is de afgelopen tien jaar enorm geïnvesteerd in het identificeren van geschikt uitgangsmateriaal en het isoleren van *R*-genen (Haverkort *et al.*, 2010). Inmiddels zijn er zo'n 10-15 *R*-genen beschikbaar. Een groot deel komt van Wageningse bodem maar ook Engelse en Amerikaanse onderzoeksgroepen zijn op dit terrein actief. Toen tien jaar geleden begonnen werd met het isoleren van *R*-genen was nog niet bekend hoe deze *R*-genen geactiveerd worden. Nu weten we dat *R*-eiwitten RXLR-effectoren herkennen en dan in actie komen, en we weten ook hoe dynamisch RXLR-effectoren zijn.



Figuur 1. De wapenwedloop tussen aardappel en *Phytophthora infestans*. Als een R-eiwit in de plant een RXLR-effector van *P. infestans* herkent is de plant resistent. In de *P. infestans* populatie treden voortdurend mutaties op die leiden tot veranderingen in de RXLR-effectoren. Als een RXLR-effector niet meer herkend wordt door het corresponderende R-eiwit is de plant vatbaar.

Als het R-eiwit een effector herkent is de plant dus resistent. Is er geen herkenning dan is de plant vatbaar en wordt ziek. Inmiddels is van zo'n zevental R-genen de bijbehorende RXLR-effector bekend en van sommige weten we wat er op DNA niveau veranderd is in een stam die erin slaagt herkenning te vermijden, met als gevolg resistentiedoorbreking (figuur 1). Dat kan zijn door volledig verlies van het RXLR-gen, een zogenaamde deletie, door puntmutaties resulterend in verschillende allelen, door frameshift-mutaties of door een grote diversiteit in de RXLR-effector. Alleen als een *P. infestans*-stam over de juiste allelen of varianten beschikt vindt herkenning plaats. In de natuurlijke populatie komen al deze varianten voor, maar die stammen die niet meer herkend worden kunnen zich verspreiden en gaan de epidemie domineren. Dit is de verklaring voor de teleurstelling die veel aardappelveredelaars in het begin van de vorige eeuw hebben ervaren toen ze pogingen deden om duurzame resistentie tegen de aardappelziekte uit wilde soorten te benutten.

Het is duidelijk dat we niet klakkeloos elk R-gen kunnen gaan gebruiken zonder te weten wat de flexibiliteit is van de bijbehorende RXLR-effector en hoe de variatie in de natuurlijke *P. infestans* populatie er uitziet. Alleen dan kunnen we de duurzaamheid van een R-gen voorspellen. De uitdaging is te achterhalen wat *P. infestans* in zijn mars heeft. Dat betekent dat voor elk veelbelovend R-gen de

bijbehorende effector moet worden opgespoord. Vervolgens moet onderzocht worden wat de variatie is van de effector in de natuurlijke populatie en welke varianten wel en niet herkend worden door het R-gen. Op basis van op maat gemaakte DNA-diagnostiek kunnen we dan heel snel monitoren wat voor stammen er in het veld rondzweven en voorspellen welke cultivars geen last zullen hebben van de epidemie en welke wel. In het laatste geval zal bespuiting het redmiddel zijn, terwijl in het eerste geval de boer met een gerust hart de spuitmachine in de schuur kan laten staan.

Ik durf niet te voorspellen wanneer een dergelijk monitoring systeem operatief zal zijn. Dat hangt af van de snelheid waarmee we nieuwe combinaties van R-genen en RXLR-effectoren kunnen identificeren en, meer nog, of we in staat zijn vast te stellen welke varianten van de RXLR-effectoren verantwoordelijk zijn voor het fenotype. We weten uit onderzoek aan Avr-blb1, die herkend wordt door Rpi-blb1 uit *Solanum bulbocastanum*, dat dit niet altijd eenduidig is. Een ander struikelblok vormt de financiering die vooralsnog niet gewaarborgd is in lopende projecten. Investeren in het isoleren van R-genen is één stap. Echter, zonder investering in onderzoek naar de bijbehorende RXLR-effectoren is de uitgezette DuRPh-strategie zinloos en is het doel, duurzame resistentie tegen de aardappelziekte, niet haalbaar. Het risico dat *Phytophthora* de strijd toch gaat winnen is dan te groot.

Nieuwe aangrijpingspunten voor bestrijding Ten slotte

In een tweede lijn van onderzoek richten wij ons puur op de ziekteverwekker zelf en maken ook weer dankbaar gebruik van de genomsequenties. Wij zoeken naar de zwakke schakels in de levenscyclus van *Phytophthora* en naar eigenschappen die uniek zijn voor oömyceten. Hier ligt een kans om nieuwe aangrijpingspunten te vinden voor bestrijdingmiddelen, nieuwe, unieke 'drug targets' voor middelen die alleen het doelorganisme raken en niet de gastheer of de goedaardige micro-organismen die in symbiose met de plant leven.

Op basis van vergelijkende genomanalyses hebben wij reeds ingangen gevonden die veelbelovend zijn. Een voorbeeld betreft een enzym dat membraancomponenten afbreekt, fosfolipase D of PLD (Meijer & Govers, 2006). Er bestaat een universele vorm (PXP-PLD) die in alle organismen voorkomt. Deze is opgebouwd uit vier verschillende domeinen. Uit genomanalyse blijkt dat oömyceten beschikken over een vijftal nieuwe PLDs met een unieke domeinsamenstelling. Deze vijf komen als zodanig in geen enkele ander organisme voor. Omdat de domeinsamenstelling uniek is verwachten we dat ook de biochemische activiteit uniek is. De hypothese is dat remming van deze enzymen alleen nadelig is voor oömyceten en niet voor de plant of voor de boer die de bestrijding uitvoert. Ook andere enzymen die een rol spelen in het fosfolipidemetabolisme hebben unieke domeinsamenstellingen. We hebben aanwijzingen dat dergelijke geninnovaties wijdverbreid voorkomen in oömyceten en mogelijk ook het gevolg zijn van het dynamische genoom.

Een andere ingang voor nieuwe aangrijpingspunten voor bestrijding vloeit voort uit het werk van mijn naaste collega Dr. Jos Raaijmakers. Hij toonde aan dat bodembacteriën van het geslacht *Pseudomonas* cyclische lipopeptiden (CLPs) produceren die aangrijpen op zoösporen van *Phytophthora* en *Pythium* (Raaijmakers et al. 2006). De zoösporen barsten open en verliezen daarmee hun vitaliteit. *Pseudomonas* remt ook de groei van *P. infestans* op tomaat en deze remming wordt bewerkstelligd door CLPs. Om te achterhalen waar CLPs in oömyceten aangrijpen en hoe de groeiremming van mycelium en lysis van zoösporen tot stand komt, hebben we genen geselecteerd die tijdens CLP behandeling hoger of lager tot expressie komen (Govers et al. 2009). Deze genen bieden mogelijk een ingang tot het identificeren van oömyceet-specifieke aangrijpingspunten.

Toen ik in 1990 de overstap maakte naar *Phytophthora*-onderzoek waren er nauwelijks handvatten om deze ziekteverwekkers te doorgronden. De moleculaire fytopathologie stond nog in de kinderschoenen, *Phytophthora* werd met schimmels onder een noemer gevangen en het was zeker geen modelorganisme. Ook nu nog is de status van modelorganisme ver te zoeken en dit is de reden waarom wij al in een vroeg stadium (Kamoun et al., 1999) gestart zijn met het eerste grootschalige *Phytophthora*-sequentieproject; zonder enige externe financiering, maar met de overtuiging dat de investering de moeite waard was en de afhankelijkheid van moeizame positionele kloneringen en mutantanalyses zou verminderen.

Vanaf 2000 hebben wij internationaal de krachten gebundeld en *Phytophthora* en oömyceet genomconsortia opgericht om fondsen te werven. Nu beschikken we over enkele gesequente oömyceet-genomen, goed gevulde databanken en DNA chips. Ik hoop dat ik u overtuigd heb dat genomica en genoombiologie het onderzoek aan deze desastreuze ziekteverwekkers in een stroomversnelling heeft gebracht. Dat wat wij willen weten over oömyceten kunnen we nu rationeel benaderen en op een efficiënte wijze aanpakken.

Referenties

- Govers F & Bouwmeester K (2008) Effector trafficking: RXLR-dEER as extra gear for delivery into plant cells. *Plant Cell* 20: 1728-1730
- Govers F, Meijer HJG, Tran H, Wagemakers L & Raaijmakers JM (2009) Unraveling the senses of *Phytophthora*; leads to novel control strategies? *ISHS Acta Horticulturae* 834: 41-50
- Haas BJ, Kamoun S, Zody MC, Jiang RHY, Handsaker RE et al. (2009) Genome sequence and comparative analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* *Nature* 461: 393-398
- Haverkort AJ, Boonekamp PM, Jacobsen E, Struik PC & Visser RGF (2010) Duurzame resistentie tegen *Phytophthora*: een update. *Gewasbescherming* 41: 119-122
- Jiang RHY, Tripathy S, Govers F & Tyler BM (2008) RXLR effector reservoir in two *Phytophthora* species is dominated by a single rapidly evolving superfamily with more than 700 members. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 105: 4874-4879
- Kamoun S, Hrabec P, Sobral B, Nuss D & Govers F (1999) Initial assessment of gene diversity for the oomycete pathogen *Phytophthora infestans* based on expressed sequences. *Fungal Genetics and Biology* 28: 94-106
- Meijer HJG & Govers F (2006) Genomewide analysis of phospholipid signaling genes in *Phytophthora* spp: Novelities and a missing link. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 1337-1347
- Raaijmakers JM, Bruijn I de & Kock MJD de (2006) Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp: Diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 699-710
- Tyler BM, Tripathy S, Zhang X, Dehal P, Jiang RHY et al. (2006) *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* 313: 1261-1266