

Drug transporters of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*

Ramin Roohparvar

Op 26 februari 2007 promoveerde Ramin Roohparvar aan Wageningen Universiteit op het proefschrift getiteld "Drug transporters of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*". Promotor was Prof. Dr. Ir. P.J.G.M. de Wit, verbonden aan de leerstoelgroep Fytopathologie, Wageningen Universiteit. Co-promotoren waren Dr. L.-H. Zwiars (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht) en Dr. M.A. de Waard (leerstoelgroep Fytopathologie, Wageningen Universiteit). Het onderzoek werd uitgevoerd bij de leerstoelgroep Fytopathologie en gefinancierd door de "Agricultural Research and Education Organization" (AREO) van Iran en het "Iranian Ministry of Science, Research, and Technology".

Inleiding

In de natuur worden levende organismen voortdurend blootgesteld aan toxische verbindingen geproduceerd door andere organismen. Planten kunnen bijvoorbeeld fungitoxische afweerstoffen maken die een rol spelen bij de bescherming tegen schimmels die plantenziekten veroorzaken. Schimmels hebben door co-evolutie vaak beschermingsmechanismen tegen deze giften verworven. Een mechanisme waarover steeds meer bekend wordt, berust op de activiteit van pompjes (transporters) in membranen van schimmelcellen die in staat zijn om giften naar buiten te pompen waardoor deze hun toxische werking in de cellen niet kunnen uitoefenen. Pompjes in schimmels kunnen ook bescherming bieden tegen schimmelbestrijdingsmiddelen zoals fungiciden (De Waard, 1997). In de Engelse taal worden deze pompjes aangeduid als *drug transporters*, omdat deze ook bescherming kunnen

bieden tegen geneesmiddelen (drugs) en andere verbindingen met biologische activiteit.

Mycosphaerella graminicola is een plantenpathogene schimmel die de belangrijke Septoria-bladvlekkenziekte op tarwe veroorzaakt. Uit eerder onderzoek is gebleken dat deze schimmel diverse *drug transporters* bezit die de gevoeligheid van de schimmel voor azool-fungiciden en andere verbindingen beïnvloeden (Stergiopoulos *et al.*, 2003; Zwiars *et al.*, 2002). Het proefschrift van Roohparvar beschrijft nieuwe *drug transporters* van de schimmel die behoren tot de zogenaamde *Major Facilitator Superfamily* (MFS) en *ATP-binding cassette* (ABC) *drug transporters* en verklaart hun rol bij gevoeligheid voor fungiciden en (multi)drug resistentie (MDR). Er wordt ook een nieuw type ABC-transporter beschreven met een rol in ijzermetabolisme. Remmers (modulatoren) van ABC-*drug transporters* die in plantenpathogene schimmels als viru-

lentiefactor fungeren, zouden ontwikkeld kunnen worden als indirect werkend middelen tegen plantenziekten. Daarom is tevens de werking van diverse in de medische literatuur beschreven modulatoren onderzocht op activiteit tegen de Septoria-bladvlekkenziekte op jonge tarweplanten.

De multidrug transporter *MgMfs1*

MgMfs1 is het eerste MFS-transportergen uit *M. graminicola* dat gekloneerd en gekarakteriseerd is. Het eiwit dat door het gen gecodeerd wordt, vertoont grote overeenkomst met schimmel-MFS-transporters die betrokken zijn bij de secretie van schimmeltoxinen en MDR. *MgMfs1* is niet betrokken bij virulentie op tarwe. Productie van het *MgMfs1*-eiwit in bakkersgist en fenotypische karakterisering van *M. graminicola*-isolaten waarin *MgMfs1* is uitgeschakeld laten zien dat *MgMfs1* *in vitro* functioneert als een zeer krachtige *multidrug transporter* die affiniteit heeft voor een verscheidenheid aan substraten zoals schimmeltoxinen, plantenmetabolieten en fungiciden (Tabel 1). Experimenten tonen aan dat de transporter *MgMfs1* zowel *in vitro* als *in planta* een rol speelt bij de gevoeligheid van *M. graminicola* voor het strobilurinefungicide trifloxytrobine. In *M. graminicola*-mutanten waarin

PROMOTIES

MgMfs1 is uitgeschakeld, is de efflux van dit strobilurine-fungicide verlaagd en in spuitproeven op jonge tarweplanten vertonen deze mutanten een hogere gevoeligheid voor dit middel dan wild-type isolaten. Strobilurine-resistente veldisolaten met een mutatie in de aangrijpingsplaats van strobilurinen (cytochroom b) vertonen overexpressie van *MgMfs1*. Dit zou kunnen wijzen op een beschermingsmechanisme tegen accumulatie van strobilurinen op secundaire aangrijpingsplaatsen van de middelen. Zo zou overexpressie van *MgMfs1* ervoor kunnen zorgen dat membranen normaal blijven functioneren in de aanwezigheid van strobilurinen. Dit zou van belang kunnen zijn voor het behoud van de fitness van strobilurine-resistente stammen.

De ABC-transporter *MgAtr7*

De ABC-transporter *MgAtr7* vertoont grote overeenkomst met schimmel-ABC-transporters die een rol spelen bij de gevoeligheid voor azool-fungiciden. *MgAtr7* codeert echter voor een nieuw type hybride-ABC-transporter waarvan een deel van het eiwit een motief bevat dat kenmerkend is voor een dityrosine/pyoverdine biosynthese-eiwit. Op grond hiervan wordt *MgAtr7* beschouwd als het eerste lid van een nieuwe klasse van schimmel-ABC-transporters die behalve een transporterdeel ook een biosynthesedeel bezitten. Dit type transporter lijkt voornamelijk aanwezig te zijn in *M. graminicola* en *Fusarium graminearum*. Functionele analyses tonen aan dat dit gen noch bescherming biedt tegen fungiciden noch betrokken is bij virulentie op tarwe, maar wel een rol speelt bij het handhaven van het ijzerevenwicht in de cel.

Tabel 1. Toxiciteit van fungiciden en andere verbindingen met biologische activiteit voor *Saccharomyces cerevisiae*-stam ADYes2 (controle) en ADMgMfs1 (stam ADYes2 getransformeerd met het MFS transporter-gen *MgMfs1*) in groeioproeven op agar gemengd met teststoffen.

Teststoffen	Groep	MIC ADYes2 ^a	Q-waarde ADMgMfs1 ^b
Cyproconazool	Azool	0.01	≥ 25
Epoxiconazool	Azool	0.01	≥ 25
Miconazool	Azool	0.01	≥ 100
Prochloraz	Azool	0.1	≥ 25
Propiconazool	Azool	0.025	40
Tebuconazool	Azool	0.01	≥ 25
Azoxystrobine	Strobilurine	0.01	10
Kresoxim-methyl	Strobilurine	0.01	2.5
Trifloxystrobine	Strobilurine	0.01	10
Bifonazool	Allylamine	0.25	40
Fenpiclonil	Phenylpyrrol	10	2.5
Iprodion	Dicarboximide	10	5
Cycloheximide	Antibioticum	0.05	20
Cercosporine	Schimmeltoxine	0.01	100
Diacetoxyscirpenol	Mycotoxine	1	≥ 25
Berberine	Plantenalkaloid	5	5
Camptothecine	Plantenalkaloid	5	≥ 100

^a MIC: Minimal Inhibitory Concentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$) van teststoffen die de groei van de controlestam ADYes2 juist volledig remt.

^b Q-waarde of resistentiegraad: verhouding tussen MIC-waarde van de teststoffen voor stam ADMgMfs1 en ADYes2.

Modulatoren van ABC-transporters

Modulatoren zijn verbindingen die de activiteit van ABC-transporters kunnen remmen. Veel van dergelijke verbindingen zijn al in de medische literatuur beschreven. Getest werd of deze modulatoren de fungitoxiciteit van het azool-fungicide cyproconazool tegen *M. graminicola* kunnen versterken en de ontwikkeling van de Septoria-bladvlekkenziekte op jonge tarweplanten kunnen onderdrukken. Sommige verbindingen vertonen *in vitro* inderdaad een synergistische werking met de activiteit van cyproconazool en kunnen de efflux van het fungicide uit schimmelcellen tegengaan. *In planta* is echter geen synergistische activiteit tussen deze modulatoren en cyproconazool

gevonden. Enkele van de geteste verbindingen zijn *in vitro* vrijwel niet toxisch voor *M. graminicola* maar vertonen wel een significante ziekteverende werking op jonge tarweplanten in zowel preventieve als curatieve spuitproeven. De resultaten suggereren dat dergelijke verbindingen een indirecte werking bezitten door modulatie van ABC-transporters die betrokken zijn bij virulentie van schimmels. De ontdekking van zulke modulatoren kan leiden tot de ontwikkeling van een nieuwe klasse van middelen met een ziekteverende werking.

Conclusies en vooruitblik

Dit proefschrift levert een belangrijke bijdrage aan de wetenschap dat *drug transporters* een significante rol spelen bij

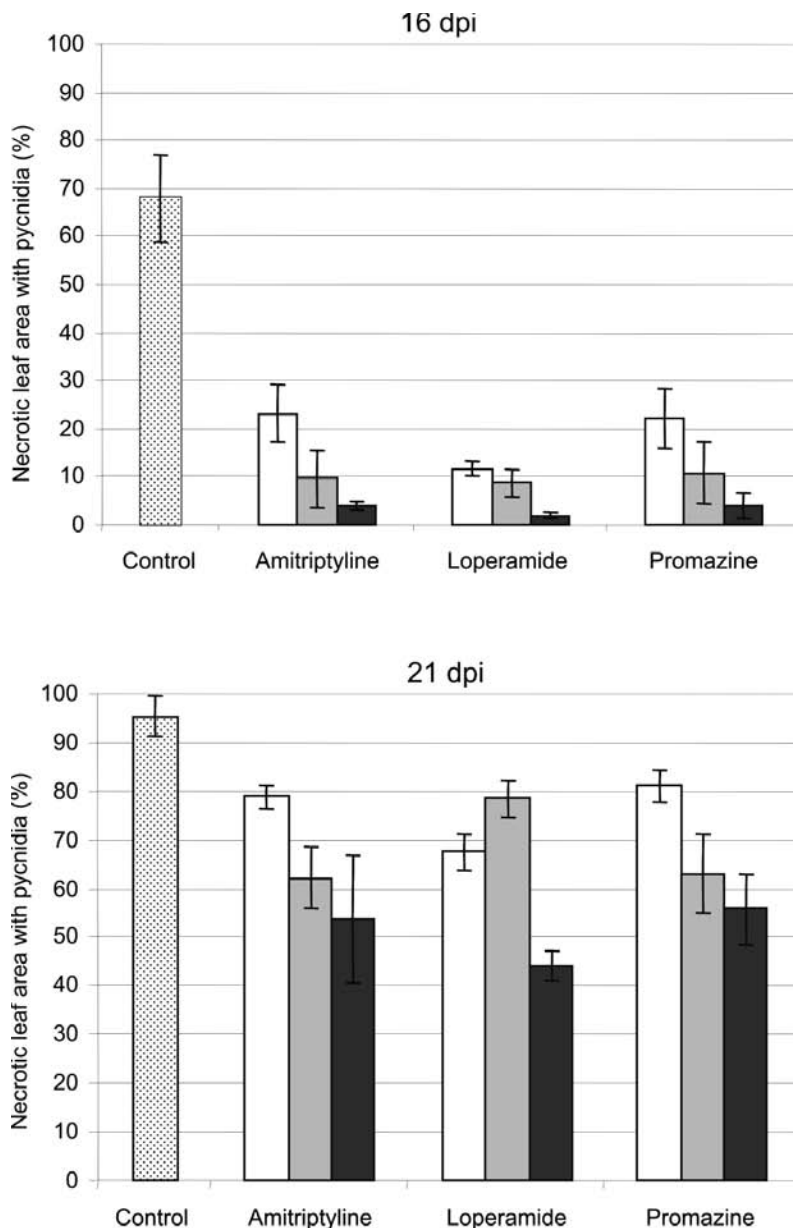


PROMOTIES

gevoeligheid en (multi)drug-resistentie van schimmels tegen fungiciden. Bij *M. graminicola* kan de transporter MgMfs1 bijdragen aan een normale fitness van strobilurine-resistente veldisolaten. Dit inzicht is nieuw en draagt bij tot een beter inzicht in de overlevingskansen van fungiciden-resistente populaties van het pathogeen. Het is niet uitgesloten dat vergelijkbare *drug transporters* een rol spelen bij resistentie tegen andere specifiek werkende middelen en in andere plantenpathogenen. De rol van de ABC-transporter MgAtr7 met een nog niet eerder beschreven functie in ijzerevenwicht dient nader te worden onderzocht. Het vermogen van niet-fungitoxische modulatoren om plantenziekten te bestrijden is ook niet eerder gepubliceerd. Tot nu toe zijn slechts enkele middelen met een indirecte werking toegelaten voor de bestrijding van plantenziekten. Mogelijk kan het uitgevoerde onderzoek dienen als leidraad bij de ontwikkeling van nieuwe ziekteverende middelen met een indirecte werking.

Literatuur

- De Waard, M.A., 1997. Significance of ABC transporters in fungicide sensitivity and resistance. *Pesticide Science* 51, 271-275.
- Stergiopoulos, I., Van Nistelrooy, J.G.M., Kema, G.H.J. & De Waard, M.A., 2003. Multiple mechanisms account for variation in baseline sensitivity to azole fungicides in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science* 59, 1333-1343.
- Zwiers, L.-H., Stergiopoulos, I., Van Nistelrooy, J.G.M. & De Waard, M.A., 2002. ABC transporters and azole susceptibility in laboratory strains of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 3900-3906.



Figuur 1. Activiteit van amitriptyline, loperamide en promazine (geneesmiddelen met modulerende werking van ABC-transporters) op de ontwikkeling van *Mycosphaerella graminicola* op jonge tarweplanten in curatieve spuitproeven. Geteste concentraties: 1 (witte kolommen), 10 (grijze kolommen) en 100 mg L⁻¹ (zwarte kolommen). De kolommen geven het gemiddelde percentage genecrotiseerd bladoppervlak met pycnidiën met standaarddeviatie weer op 16 en 21 dagen na inoculatie (dpi). De geteste verbindingen zijn *in vitro* vrijwel niet toxisch voor *M. graminicola*.

