

Zonder strijd geen overwinning

Een geïntegreerde aanpak om *Phytophthora* uit te schakelen

Francine Govers

Laboratorium voor
Fytopathologie
Wageningen University
francine.govers@wur.nl

Plantenvernietigers

Phytophthora soorten zijn desastreuze ziekteverwekkers. De meest bekende en meest beruchte is *Phytophthora infestans*, de veroorzaker van de aardappelziekte. Deze soort is in 1876 voor het eerst beschreven door Anton De Bary, de grondlegger van de mycologie, en was de eerste in een geslacht dat nu ruim 150 soorten telt, allemaal 'plantenvernietigers' - het Griekse woord 'phyton' betekent plant en 'phthora' vernietiging. En nog steeds worden er nieuwe *Phytophthora* soorten ontdekt. De laatste decennia zijn regelmatig *Phytophthora* soorten in het nieuws die bomen aantasten en toeslaan in bosrijke gebieden. Een voorbeeld is *Phytophthora ramorum*, voor het eerst waargenomen in de jaren negentig van de vorige eeuw in het westen van de Verenigde Staten als veroorzaker van Sudden Oak Death en inmiddels ook massaal in opmars in Engeland waar met name lariksen het slachtoffer zijn. Andere voorbeelden zijn *Phytophthora kernoviae*, ontdekt in Engeland in 2003 op beuk en rododendrons en met een brede waardplantenreeks, en *Phytophthora alni* die wijdverbreid in Europa elzen aantast. In veel gevallen blijkt het te gaan om een soort die ontsnapt is uit zijn oorsprongsgebied. Door de toenemende wereldwijde handel in bomen en siergewassen neemt de kans op introductie van nieuwe soorten toe. Uit een jarenlange inspectie van 732 Europese kwekerijen (bomen, struiken en siergewassen) is gebleken dat daar 68 *Phytophthora* soorten/taxa aanwezig waren waaronder 47 exotische soorten en zeven die voor de eerste keer in Europa waren aangetroffen (Jung et al., 2016). Voldoende reden om alert te zijn en nog betere detectiesystemen te ontwikkelen en te implementeren.

De oömyceet *Phytophthora infestans*

Toen de aardappelziekte voor het eerst toesloeg in Europa, en de Ieren massaal ten onder gingen aan de hongerdood, tastte men in het duister over de oorzaak. Was het de industrialisatie die de planten verzwakte of was het een straf van God, die ontstemd was over de toenemende bevolkingsgroei, en donder en bliksem inzette om de oogst

te vernietigen? In het midden van de 19^{de} eeuw was de idee dat micro-organismen ziektes kunnen veroorzaken nog niet geland. De verzwakte planten raakten weliswaar beschimmeld maar dit werd eerder gezien als gevolg en niet als oorzaak. In de tijd dat Louis Pasteur de 'microbe-theorie' ontwikkelde (rond 1860) en het causale verband aantoonde tussen bepaalde ziekten bij de mens en microbiële ziekteverwekkers, experimenteerde Anton de Bary met het schimmelachtige organisme dat geïsoleerd was uit zieke aardappelplanten. Hij gebruikte de sporen gevormd in reincultuur om gezonde planten te inoculeren en leverde daarmee het bewijs dat dit organisme de oorzaak is van de aardappelziekte. Hij gaf de 'aardappelschimmel' de naam *Phytophthora infestans* en gezien de groeiwijze in de vorm van hyfen en de verspreiding via sporen, was het niet verwonderlijk dat *P. infestans* toentertijd werd ingedeeld in het schimmelryk en wel in de klasse der oömyceten. Dit zijn waterschimmels die het beste gedijen in een vochtige omgeving en eivormige geslachtelijke sporen vormen, zogeheten oösporen. Naast de ~150 *Phytophthora* soorten zijn er nog vele andere oömyceten die plantenziekten veroorzaken zoals de valse meeldauwen en de vele *Pythium* soorten. Classificatie op basis van morfologie is echter misleidend. Uit DNA analyses is gebleken dat oömyceten geheel onafhankelijk van schimmels zijn geëvolueerd en ze worden nu geclassificeerd in de Straminopila samen met onder andere bruinwieren en kiezelalgen. Het vermoeden dat oömyceten anders zijn dan schimmels bestond echter al langer. Ze bezetten dezelfde ecologische niche en oefenen vergelijkbare functies uit maar het mechanisme verschilt. *Phytophthora* soorten maken bijvoorbeeld geen sterolen en zijn daarom ongevoelig voor SBIs, chemische bestrijdingsmiddelen die de ergosterol biosynthese remmen. Ook chitinases, een van de PR eiwitten ('pathogenesis related proteins') die planten aanmaken als ze worden aangevallen door een ziekteverwekker, hebben geen vat op oömyceten. Wel op schimmels want die hebben chitine in hun celwand terwijl de celwand van oömyceten voornamelijk uit cellulose bestaat. Andere typische eigenschappen zijn de zwemsporen (zoösporen) met twee verschillende zweepdraden alsook de diploidie.

Bestrijding van de aardappelziekte; een geïntegreerde aanpak

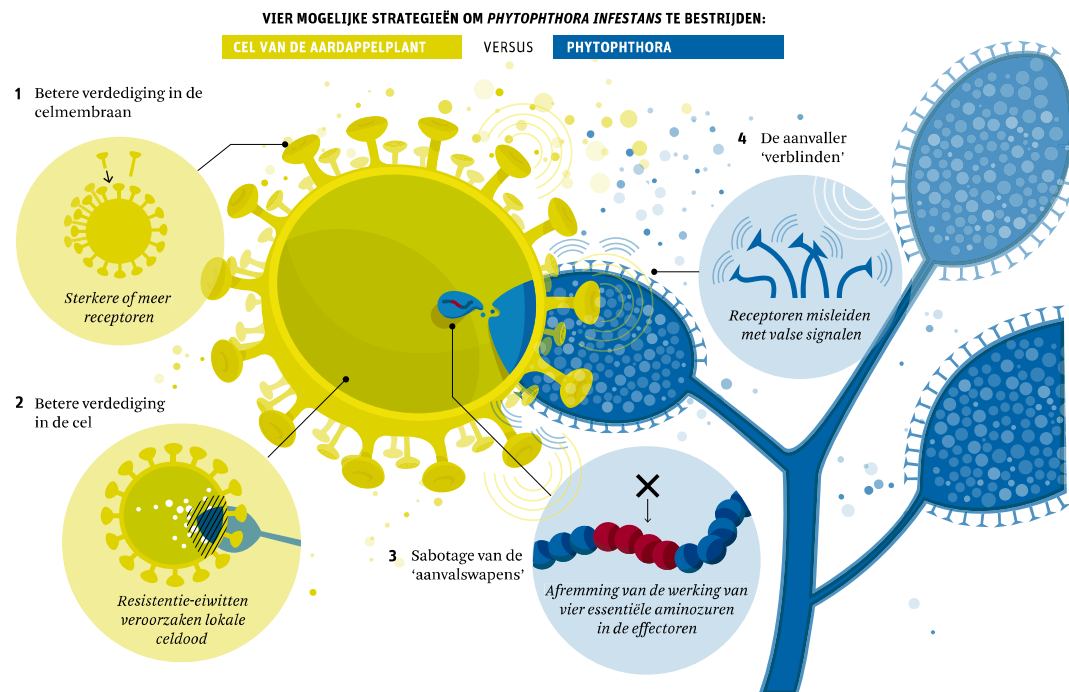
Dat *Phytophthora infestans* een geduchte ziekteverwekker is en moeilijk te bestrijden, is alom bekend. In de aardappelveredeling is *Phytophthora* resistentie een van de eigenschappen die hoog op het verlanglijstje staat. De beschikbaarheid van resistente cultivars is echter te beperkt en de meeste telers passen chemische bestrijding toe om een rendabele oogst te waarborgen. Bestrijding van de aardappelziekte vereist een geïntegreerde aanpak: versterking van afweer in de plant en verzwakking van de ziekteverwekker (schematisch weergegeven in Figuur 1). Voor het ontwikkelen van nieuwe strategieën is het essentieel om inzicht te hebben in de wapenwedloop tussen plant en ziekteverwekker en de verdedigings- en aanvalsmechanismes te ontrafelen.

Twee verdedigingslijnies

De eerste barrière die een ziekteverwekker tegenkomt is de celwand direct gevolgd door de

celmembraan. In de celmembraan zitten allerlei verschillende receptoren waaronder een aantal die geactiveerd worden als een ziekteverwekker probeert binnen te dringen. Voor sommigen van deze receptoren is aangetoond dat ze bijdragen aan afweer tegen *P. infestans* (Wang & Bouwmeester, 2016; Bouwmeester et al., 2014; Du et al., 2015). Als het coderende gen gemuteerd is wordt de plant gevoeliger voor infectie, en als de expressie opgeschroefd wordt, waardoor er meer van de betreffende receptor in de celmembraan terechtkomt, is de plant minder gevoelig. In dat laatste geval wordt *P. infestans* geremd, en zijn de lesies kleiner of verschijnen later. Dergelijke studies laten zien dat het de moeite waard is om deze receptoren verder te onderzoeken en te kijken of met gerichte technieken geselecteerd kan worden voor de best werkende varianten van deze receptoren.

De tweede en best bestudeerde verdedigingslinie bevindt zich in de cel. Dat zijn de resistentie-eiwitten (R-eiwitten) die hun oorsprong hebben in wilde *Solanum* soorten uit Midden- en Zuid-Amerika, en waarvan activatie voldoende is om infectie volledig te blokkeren (Vleeshouwers et



Figuur 1. Artistieke weergave van de plant-Phytophthora interactie.

Links, in groen, een plantencel met de twee verdedigingslijnies (1,2) en rechts, in blauw, Phytophthora, weergegeven als drie sporangia op een sporangiofoor. Sporangia kunnen direct de plant infecteren of veranderen in een zoösporangium. Hieruit komen zoösporen vrij die al zwemmende op zoek gaan naar een geschikte plek om te infecteren. In alle gevallen gebruikt Phytophthora receptoren om signalen uit de omgeving op te vangen en RXLR-effectoren om afweer in de plant te onderdrukken om zo de weg vrij te maken voor verdere kolonisatie. Doelgerichte 'sabotage' (3) en 'misleiding' (4) lijken effectieve manieren te zijn om het infectieproces te verstoren. Copyright: www.steffiepadmos.com.

al., 2011). Immers, hun activatie leidt tot celdood en als enkele cellen doodgaan op de plek waar *P. infestans* probeert binnen te dringen is dit afdoende om de ziekteverwekker te stoppen. Al in het begin van de vorige eeuw werd begonnen met het kruisen van de cultuuraardappel *Solanum tuberosum*, met een wilde aardappelsoort uit Mexico, *Solanum demissum*, met als doel de *Phytophthora* resistentie uit *S. demissum* over te brengen. Dat lukte, maar de snelheid waarmee de resistentie verloren ging deed vermoeden dat de ziekteverwekker wel zeer behendig was in het aanpassen aan nieuwe omstandigheden. Ook resistenties uit andere wilde *Solanum* soorten houden meestal niet lang stand. Met de kennis die we nu hebben over *P. infestans*, met name over de organisatie van het genoom, kunnen we deze dynamiek verklaren. De ingekruiste wilde *Solanum* genen coderen voor bovengenoemde R-eiwitten. Deze herkennen specifieke eiwitten van de ziekteverwekker – een typische ‘gen-om-gen’ relatie (de Wit, 2019) – en dit leidt tot lokale celdood, de meest effectieve manier om infectie te blokkeren. R-eiwitten die effectief zijn tegen *Phytophthora* herkennen zogeheten RXLR-effectoren. Alle *Phytophthora* soorten beschikken over een groot en divers arsenaal aan RXLR-effectoren (Govers, 2010). Iedere soort heeft zijn eigen set en ze zijn bepalend voor de gastheerspecificiteit. *P. infestans* heeft meer dan 550 RXLR-effector genen waarvan er meer dan 200 actief zijn tijdens infectie van aardappel. *Phytophthora* beschikt over een mechanisme dat ervoor zorgt dat de RXLR-effectoren na uitscheiding naar de binnenkant van de plantencel worden getransporteerd. Eenmaal binnen gaan ze de plantencel manipuleren door allerlei processen te verstoren die de plant gebruikt om zich te verweren tegen ziekteverwekkers. *Phytophthora* kan dan ongestoord zijn gang gaan, voedingstoffen opnemen, het blad koloniseren en sporuleren, terwijl de gastheer ten onder gaat. Dit gebeurt niet in een resistente cultivar waarin het R-eiwit de bijpassende RXLR-effector herkent en celdood activeert. Echter, onder druk van het R-eiwit treden mutaties op in het RXLR-effector gen waardoor *Phytophthora* herkenning kan ontwijken en de resistentie doorbroken is. Als een cultivar over verschillende R-eiwitten beschikt duurt het langer voordat de resistentie doorbroken is en het stapelen van R-genen is dan ook een benadering die veelbelovend is. Als dit dan ook nog gecombineerd wordt met een versterking van de eerste verdedigingslinie, zal *P. infestans* nog meer moeite moeten doen om door te breken.

Phytophthora ontwapenen

Er zijn inmiddels voldoende aanwijzingen dat het belangrijkste wapenarsenaal van *Phytophthora* bestaat uit RXLR-effectoren. Iedere RXLR-effector die tot nu toe bestudeerd is, is uniek en grijpt in op een ander planteneiwit; het hele arsenaal tezamen ontregelt een groot aantal cellulaire processen overal in de cel en in iedere celorganel (Whisson et al., 2016; Wang et al., 2019). Het beeld is nog lang niet compleet maar het is duidelijk dat *Phytophthora* zich niet gemakkelijk overgeeft. Een RXLR-effector is opgebouwd uit een signaalpeptide, een RXLR-domein en een effectordomein. De uniciteit van een RXLR-effector bevindt zich in het effectordomein. Dat varieert in lengte en aminozuursamenstelling en bestaat vaak uit herkenbare motieven die bepalend zijn voor de driedimensionale structuur van het eiwit. Dit is ook het domein dat herkend wordt door een R-eiwit. In veel gevallen blijkt dat mutaties in het effectordomein die tot verlies van herkenning leiden, geen effect hebben op de afweer-onderdrukkende capaciteit van de effector. Het signaalpeptide zorgt ervoor dat *Phytophthora* het eiwit via de normale route kan uitscheiden en wordt daarbij afgesnoerd. Het RXLR-domein bevat het RXLR-motief. Dit bestaat uit vier aminozuren – een arginine (R) op positie 1 en 4, een leucine (L) op positie 3 en een X (elk willekeurig aminozuur) op positie 2 – en is essentieel voor opname van de effector in de plantencel. Hoe dit precies in zijn werk gaat is niet bekend. Wat wel vaststaat is dat een RXLR-effector met een gemuteerd RXLR-motief zijn eindbestemming niet kan bereiken. Is dit nu de zwakke plek die we zoeken? Kunnen we het belangrijkste wapenarsenaal van *Phytophthora* uitschakelen door te voorkomen dat RXLR-effectoren massaal hun eindbestemming missen? En hoe moet dat? Dat is een vraag die veel onderzoekers vanuit verschillende invalshoeken proberen te beantwoorden.

Er bestaan aanwijzingen dat ergens in het proces het RXLR-domein en het effectordomein gesplitst worden en het is aannemelijk dat het RXLR-motief een essentieel herkenningspunt is voor een enzym dat de splitsing bewerkstelligt. Uit studies aan de malariaparasiet *Plasmodium* is gebleken dat het enzym ‘aspartic protease’ (AP) een splitsing katalyseert in effectoren die een motief bevatten dat sterk lijkt op het RXLR-motief. Als onderdeel van het promotieonderzoek van Chara Schoina (Schoina, 2018) hebben wij onderzoek gedaan of *Phytophthora* ook APs heeft en of deze APs belangrijk zijn voor virulentie. Van de twaalf AP genen in *P. infestans* zijn er drie (AP10, AP11 en AP12) die coderen voor een AP dat sterk lijkt op het *Plasmodium* AP. *P. infestans* transformanten

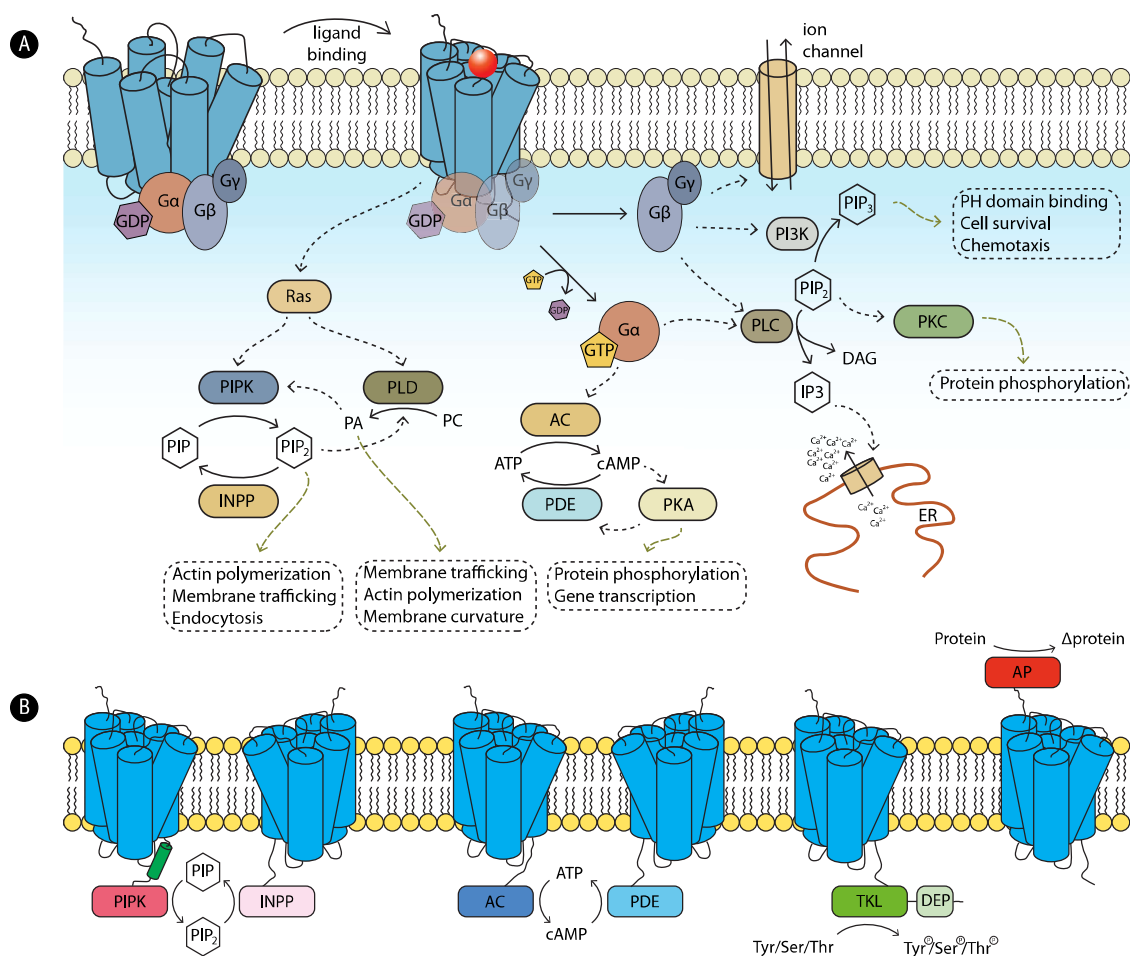
waarin de expressie van het AP10 gen of het AP12 gen verlaagd is bleken minder virulent te zijn (Schoina et al., 2019). Voor AP11 vonden we dat niet. De verminderde virulentie suggereert dat de twee APs een rol hebben in het infectieproces maar of dit het gevolg is van verdwaalde RXLR-effectoren is nog een open vraag die moeilijk te beantwoorden is met de huidige beschikbare detectiemethodes. We hebben wel een in vitro test uitgevoerd en daaruit bleek dat AP10 en AP12, maar niet AP11, een RXLR-effector kunnen knippen: blootstelling aan de APs leidde tot een kleiner Avr4 eiwit. Verder onderzoek moet uitwijzen of ook andere RXLR-effectoren geknipt worden door deze APs, waar precies de splitsing plaatsvindt en of dit ook in vivo gebeurt.

Als ons onderzoek of dat van anderen kan ophelderen wat de cruciale stappen zijn in het afleveren van RXLR-effectoren in de plantencel dan is de volgende stap iets te vinden dat dit proces blokkeert. Als bijvoorbeeld AP10 en/of AP12 cruciaal blijken te zijn, dan kan een specifieke en effectieve remmer van dit enzym al voldoende zijn om *Phytophthora* te verzwakken of in te dammen. Zo'n remmer kan de actieve ingrediënt zijn van een bestrijdingsmiddel of kan als extra verdedigingslinie door de plant worden ingezet. Biologische bestrijding met (gemodificeerde) micro-organismen die een dergelijke remmer produceren zou ook een optie kunnen zijn maar dan met name gericht op *Phytophthora* soorten die via wortels infecteren.

***Phytophthora* misleiden**

Ieder levend organisme is in staat om signalen uit de omgeving op te vangen en daarop te reageren. Voor een ziekteverwekker is het bijvoorbeeld belangrijk om te weten wanneer er een geschikte gastheer in de buurt is zodat de aanval ingezet kan worden. Het ontvangen van externe signalen en de signaaloverdracht in de cel die tot cellulaire responsen leidt, wordt nauwlettend gereguleerd en vereist het optimaal functioneren van zeer complexe regelsystemen (Figuur 2A). Zo'n 20 jaar geleden zijn we begonnen met het ontrafelen van signaaloverdracht in *Phytophthora*, met name de signalering via G-eiwitten en fosfolipiden, met de idee dat we hiermee zwakke plekken in deze ziekteverwekker zouden kunnen blootleggen. Als immers blijkt dat het gericht uitschakelen van een component in de signaaloverdracht leidt tot een kreupele ziekteverwekker die niet langer kan infecteren dan is die betreffende component, mits uniek, interessant als doelwit voor een bestrijdingsmiddel. De drie geteste componenten in de

G-eiwit signalering, de $G\alpha$ -, $G\beta$ - en $G\gamma$ -subeenheid die tezamen het heterotrimere G-eiwit vormen, bleken cruciaal te zijn voor sporulatie en/of infectie (Latijnhouwers 2003a; 2003b). Zo bepaalt de $G\alpha$ -subeenheid het zwemgedrag van zoösporen en zonder een goed functionerende $G\alpha$ -subeenheid kan *Phytophthora* zijn waardplant niet vinden. Zonder een goed functionerende $G\beta$ worden geen sporen gevormd. De subeenheden van het heterotrimere G-eiwit zijn echter universele eiwitten die in alle eukaryoten voorkomen en zeer geconserveerd zijn en daarom niet geschikt als doelwit. Een vierde geteste component, ook met een rol in sporulatie en infectie, is echter wel uniek (Hua et al., 2013). Dit eiwit (genaamd GPCR-PIPK-4), dat lijkt op een antenne-eiwit met een G-eiwit gekoppelde receptor (GPCR) in de celmembraan en een intracellulair domein met een functie in de fosfolipide-signaaloverdracht, is aanwezig in alle oömyceten en daarnaast alleen in een zeer beperkt aantal micro-organismen, allen waterminnende soorten. Daarbuiten komt het niet voor en dit maakt het een interessant doelwit voor bestrijding. Als onderdeel van zijn promotieonderzoek heeft Johan van den Hoogen (van den Hoogen, 2018) vergelijkende genom analyses uitgevoerd en aangetoond dat oömyceten veel meer van dergelijke unieke antenne-eiwitten hebben. GPCR-PIPK-4 behoort tot een familie met 12 leden die allen tot expressie komen tijdens de levenscyclus van *Phytophthora* maar verschillen in het stadium waarin ze het meest actief zijn (Hua et al., 2013). Dit wijst op een specialisatie in functie binnen de familie. Ook GPCRs komen universeel voor in alle eukaryoten maar in tegenstelling tot de drie G-eiwit subeenheden zijn ze veel minder geconserveerd en heeft ieder organisme een groot aantal van deze receptoren met daarin een grote diversiteit. Zo heeft de mens meer dan 1000 GPCRs die in allerlei lichaamsprocessen een rol spelen en een uiterst belangrijke functie hebben in het ontvangen van allerlei verschillende externe signalen. Dat een juiste, nauw gereguleerde signaaloverdracht van buiten naar binnen van levensbelang is, blijkt wel uit het feit dat merendeel van onze geneesmiddelen een GPCR als doelwit hebben. *Phytophthora* heeft 132 GPCR genen en 44 daarvan zijn bijzonder omdat ze coderen voor zogeheten 'GPCR-bigrams'. GPCR-PIPK-4 is hiervan een voorbeeld. 'GPCR-bigrams' beschikken over een extra enzymatisch domein naast het GPCR domein (Figuur 2B) en lijken daarmee in staat signalen direct door te schakelen naar intracellulaire signaaloverdrachtroutes, zonder een tussenstap via het heterotrimere G-eiwit (van den Hoogen & Govers, 2018). Dit is een uiterst interessante hypothese die niet eerder beschreven is en uiteraard getest moet worden.



Figuur 2. Opmerkelijke vindingen in signaaloverdracht in oömyceten.

Het ontvangen van externe signalen en de signaaloverdracht in de cel die tot cellulaire responsen leidt, wordt nauwlettend gereguleerd en vereist het optimaal functioneren van zeer complexe regelsystemen. In (A) staan signaaloverdrachtroutes weergegeven die representatief zijn voor nagenoeg alle eukaryoten die op dit niveau onderzocht zijn. Het is aannemelijk dat ook oömyceten vergelijkbare regelsystemen gebruiken. Opmerkelijk genoeg ontbreekt in *Phytophthora* een gen dat codeert voor fosfolipase C (PLC), een sleutelenzym in de fosfolipide signalering. Het is mogelijk dat *Phytophthora* over andere eiwitten beschikt met vergelijkbare enzymactiviteit maar die we niet als zodanig kunnen herkennen en classificeren als 'onbekend'. Daarnaast beschikken oömyceten over een bijzondere set aan zogeheten 'GPCR-bigrams' weergegeven in (B). Het fictief plaatsen van GPCR-PIPK, GPCR-INPP, GPCR-AC en GPCR-PDE in het generieke overzicht in (A) wekt de suggestie dat oömyceten in staat zijn externe signalen direct door te schakelen naar intracellulaire signaaloverdrachtroutes, zonder een tussenstap via het heterotrimer G-eiwit. Of dit ook daadwerkelijk gebeurt, is nog niet onderzocht.

(A). In signaaloverdracht in eukaryoten spelen G-eiwitten een sleutelrol. Een G-eiwit gekoppelde receptor (GPCR) bestaat uit zeven transmembraan helices (blauwe cylinders) en is geassocieerd met het inactieve heterotrimer G-eiwit waarin de $G\alpha$ -subeenheid gebonden is aan GDP. Door een extern signaal, veelal een peptide of een anorganische component, al dan niet vluchtig (liganden), verandert de conformatie van de GPCR waardoor het heterotrimer G-eiwit vrijkomt van de GPCR en dissocieert in een $G\alpha$ en $G\beta\gamma$. De geactiveerde $G\alpha$ and $G\beta\gamma$ subeenheden activeren op hun beurt de volgende componenten in de signaaloverdracht route. Ook kleine G-eiwitten zoals Ras, kunnen andere, verderop gelegen componenten activeren. De verschillende signaaloverdrachtroutes leiden uiteindelijk tot een diversiteit aan cellulaire responsen (weergegeven in blokken). Afkortingen: AC: adenylate cyclase; PDE: phosphodiesterase; PKA: protein kinase A; PKC: protein kinase C; PLC: phospholipase C; PI3K: phosphatidylinositol kinase; PIPK: phosphatidylinositolphosphate kinase; INPP: inositol polyphosphate phosphatase; PIP: phosphatidylinositolphosphate; PLD: phospholipase D; PA: phosphatidic acid; PC: phosphatidylcholine; ER: endoplasmic reticulum; IP3: inositoltrisphosphate; DAG: diacylglycerol. Overgenomen uit van den Hoogen, 2018.

(B). Schematische weergave van de opbouw van 'GPCR-bigrams' in oömyceten en hun voorspelde katalytische activiteit. Het G-eiwit gekoppelde receptor domein (blauwe cylinders) bestaat uit zeven transmembraan helices. De katalytische domeinen zijn PIPK (phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase) en INPP (inositol polyphosphate phosphatase), beide betrokken bij fosfolipide signalering, AC (adenylate cyclase) en PDE (phosphodiesterase) met een rol in conversie van een cyclisch nucleotide, TKL (tyrosine kinase-like) voor eiwitfosforylering en het protease AP (aspartic protease). *Phytophthora infestans* heeft 12 genen die coderen voor een GPCR-PIPK, 7 voor GPCR-INPP, 4 voor GPCR-AC, 3 voor GPCR-PDE, 17 voor GPCR-TKL en 1 voor AP-GPCR. PIP = phosphatidylinositol; DEP = Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin. Overgenomen uit van den Hoogen et al., 2018.

Het feit dat vijf van zes type 'GPCR-bigrams' uniek zijn voor oömyceten – alleen GPCR-PIPKs zijn ook gevonden in een beperkt aantal waterminnende micro-organismen – biedt aanknopingspunten voor oömyceet-specifieke bestrijdingsmiddelen die andere organismen ongemoeid laten. Vergelijkbaar met geneesmiddelen die op GPCRs inwerken zou zo'n bestrijdingsmiddel kunnen bestaan uit een ligand, bijvoorbeeld een peptide of een anorganisch molecuul dat specifiek bindt aan een GPCR en zo deze receptor misleidt. Wat de natuurlijke liganden zijn van de 'GPCR-bigrams' in *Phytophthora* weten we nog niet en identificatie hiervan vereist nogal wat inzet. Alvorens hierin te investeren is het van belang om uit te zoeken welke van de 'GPCR-bigrams', na uitschakeling, *Phytophthora* zodanig ontwapenen dat deze niet meer kan infecteren. Zoals boven genoemd hebben we dat al getest voor een 'GPCR-bigram', GPCR-PIPK-4, door het coderende gen te 'silencen', en daarmee het expressieniveau aanmerkelijk te reduceren. De 'gesilencede' transformanten waren minder virulent en hun sporen waren gedeformeerd, voldoende aanwijzingen om GPCR-PIPK-4 als aantrekkelijk doelwit te typeren (Hua et al., 2013). Met 'gene-silencing' is het echter niet mogelijk het coderende gen volledig uit te schakelen; dat kan in theorie wel met CRISPR-Cas, een 'gene-editing' methode gebaseerd op het immuunsysteem in bacteriën en sterk in opmars in de levenswetenschappen. CRISPR-Cas werkt aantoonbaar in sommige *Phytophthora* soorten, waaronder *P. sojae* en *P. capsici*, maar vooralsnog niet in *P. infestans*. Onze pogingen en ook die van onderzoeksgroepen elders, hebben nog niet tot het gewenste resultaat geleid. Als CRISPR-Cas in *P. infestans* eenmaal werkt kan veel gericht en efficiënter onderzocht worden welke doelwitten prioriteit hebben en ligt de weg open voor de volgende stap, identificatie van de liganden.

Andere doelwitten in *Phytophthora*

De strijd voeren via ontwapening en misleiding vereist gedegen kennis van de vijand. Door de DNA-revolutie en het ontrafelen van genoom-sequenties is het onderzoek aan *Phytophthora* en andere oömyceten in een stroomversnelling geraakt. Maar ook andere technische ontwikkelingen in de levenswetenschappen leveren een belangrijke impuls. CRISPR-Cas 'genoom-editing' is al genoemd. 'Live-cell imaging' biedt weer andere openingen: het kijken in de levende cel met de mogelijkheid het gedrag van individuele eiwitten op subcellulair niveau te bestuderen. In nauwe samenwerking met Tijs Ketelaar van het Laboratorium voor Celbiologie (WUR)

onderzoeken wij het cytoskelet in *Phytophthora*, het netwerk van eiwitten en eiwitcomplexen dat de cel stevigheid, vorm en beweeglijkheid geeft. Actine en tubuline zijn belangrijke bouwstenen van het cytoskeleton en van beiden hebben we het gedrag in *Phytophthora* met 'live cell imaging' in beeld gebracht. Het actine cytoskelet in hyfen bestaat uit kabels en zogeheten 'plaques', bolvormige structuren waarin actine verweven is, waarschijnlijk in een netwerk van verschillende eiwitten waaronder actine-bindende eiwitten (Figuur 3) (Meijer et al., 2014). In appressoria, de druklichaampjes die *Phytophthora* vormt tijdens het infectieproces om de plant te kunnen binnendringen, zien we een stervormige, kortlevende actine-structuur (Kots et al., 2017). De 'plaques' hebben onze speciale aandacht, wederom vanwege het feit dat ze alleen in oömyceten voorkomen en daarmee mogelijk een interessant doelwit zijn voor bestrijding. Actine is sterk geconserveerd in eukaryoten en daarom niet geschikt als doelwit. Als we kunnen achterhalen welke andere eiwitten onderdeel uitmaken van de 'plaques' kunnen we mogelijk wel een doelwit vinden dat bij gerichte afbraak *Phytophthora* kan ontwapenen. Immers behandeling van *Phytophthora* met latrunculin B, een stof die actinestructuren depolymeriseert, leidt tot groeiremming en deformatie, een toestand die de vitaliteit van *Phytophthora* aantast.



Figuur 3. Kiemende cysten van *Phytophthora infestans*. Het actine cytoskelet bestaande uit kabels en 'plaques' is zichtbaar gemaakt met 'live cell imaging' van een *P. infestans* transformant waarin een fluorescerend eiwit gekoppeld is aan actine. De tips van de hyfen zijn verdikt en zullen spoedig uitgroeien tot appressoria, infectiestructuren die na hechting aan het plantoppervlak een penetratiepin vormen om de celwand te doorboren. Foto: Kiki Kots.

Tot slot

De strijd tussen *Phytophthora* en de waardplant wordt op vele fronten gevoerd en hetzelfde geldt voor onze strijd tegen *Phytophthora*. Onze huidige kennis over de biologie van oömyceten is vooral gebaseerd op onderzoek aan een paar *Phytophthora* soorten die van oudsher beschouwd worden als de meest prominente ziekteverwekkers omdat ze belangrijke landbouwgewassen aantasten, *P. infestans* op aardappel en *P. sojae* op soja. Recentelijk is er steeds meer aandacht voor andere soorten zoals bijvoorbeeld *P. ramorum*, *P. capsici* en *P. palmivora* en worden overeenkomsten en verschillen tussen soorten in kaart gebracht. De verdedigingslinies in de waardplant zijn veelal gericht op individuele *Phytophthora* soorten en dit geldt zeker voor de tweede linie, de *R* genen. Voortdurend worden er nieuwe *R* genen ontdekt en via marker-gestuurde veredeling ingekruisd

in cultivars. Ook genetisch gemodificeerde (GM) gewassen winnen langzaam terrein en de eerste GM aardappels met resistentie tegen *P. infestans* zijn in de Verenigde Staten al op de markt. In tegenstelling tot *R* genen, die gericht zijn tegen slechts een *Phytophthora* soort, zijn middelen die interfereren met doelwitten in *Phytophthora* veel breder inzetbaar. Immers, ontwapening door RXLR-effector opname te blokkeren of misleiding door valse signalen voor receptoren aan te bieden, en zelfs het destabiliseren van oömyceet-specifieke cytoskelet onderdelen, zullen op elke soort een negatief effect hebben. Hoewel de vertaling van fundamentele kennis naar een concrete toepassing nog niet in zicht is, is het perspectief veelbelovend. De unieke eigenschappen van oömyceten bieden voldoende mogelijkheden om zeer selectieve bestrijdingsstrategieën te ontwikkelen. De kansen liggen voor het grijpen, de beperking is de financiering.

Referenties

- Bouwmeester, K., Han, M., Blanco-Portales, R., Song, W., Weide, R., Guo, L.Y., van der Vossen, E.A.G. & Govers, F. (2014) The Arabidopsis lectin receptor kinase LecRK-I.9 enhances resistance to *Phytophthora infestans* in Solanaceous plants. *Plant Biotechnology Journal* 12, 10-16. doi: 10.1111/pbi.12111.
- de Wit, P.J.G.M. (2019) Veertig jaar onderzoek aan de bladvlekkenziekte van tomaat. *Gewasbescherming* 50 (5): 173-182
- Du, J., Verzaux, E., Chaparro-García, A., Bijsterbosch, G., Keizer, L.C.P., Zhou, J., Liebrand, T.W.H., Xie, C.H., Govers, F., Robatzek, S., van der Vossen, E.A.G., Jacobsen, E., Visser, R.G.F., Kamoun, S. & Vleeshouwers, V.G.A.A. (2015) Elicitor recognition confers enhanced resistance to *Phytophthora infestans* in potato. *Nature Plants* 1, 15034.
- Hua, C., Meijer, H.J.G., de Keijzer, J., Zhao, W., Wang, Y. & Govers, F. (2013) GK4, a G-protein-coupled receptor with a phosphatidylinositol phosphate kinase domain in *Phytophthora infestans*, is involved in sporangia development and virulence. *Molecular Microbiology* 88 (2), 352-370.
- Govers, F. (2010) *Phytophthora infestans*, een dynamische ziekteverwekker. *Gewasbescherming* 41 (3), 128 - 132.
- Jung, T., Orlikowski, L., Henricot, B., Abad-Campos, P., Aday, A.G., Aguin Casal, O., Bakonyi, J., Cacciola, S.O., Cech, T., Chavarriaga, D., Cravador, A. & Wenneker, M. (2016) Widespread *Phytophthora* infestations in European nurseries put forest, semi-natural, and horticultural ecosystems at high risk of *Phytophthora* diseases. *Forest Pathology* 46, 134-163.
- Kots, K., Meijer, H.J.G., Bouwmeester, K., Govers, F. & Ketelaar, T. (2017) Accumulation of filamentous actin in *Phytophthora infestans* during cell wall plug formation and plant cell penetration. *Cellular and Molecular Life Sciences* 74, 909-920. DOI: 10.1007/s00018-016-2383-y.
- Latijnhouwers, M.J.M. (2003a) The role of heterotrimeric G-proteins in development and virulence of *Phytophthora infestans*. PhD thesis WU Wageningen, The Netherlands. 157 pp. <https://library.wur.nl/WebQuery/wda/1679698>
- Latijnhouwers, M.J.M. (2003b) De rol van heterotrimere G-eiwitten in de ontwikkeling en virulentie van *Phytophthora infestans*. *Gewasbescherming* 34 (5) 171-174. <https://edepot.wur.nl/44215>
- Meijer, H.J.G., Hua, C., Kots, K., Ketelaar, T. & Govers, F. (2014) Actin dynamics in *Phytophthora infestans*; rapidly reorganizing cables and immobile, long-lived plaques. *Cellular Microbiology* 16, 948-961.
- Schoina, C. *Phytophthora infestans* enzymes and their role in the interaction with its hosts. PhD thesis, WU Wageningen, The Netherlands. 200 pp. <http://dx.doi.org/10.18174/449017>.
- Schoina, C., Verbeek-de Kruif, N., Govers, F. & Bouwmeester, K. (2019) Clade 5 aspartic proteases of *Phytophthora infestans* are virulence factors implied in RXLR effector cleavage. *European Journal of Plant Pathology* 154, 17-29.
- van den Hoogen, D.J., Meijer, H.J.G., Seidl, M.F. & Govers, F. (2018) The ancient link between G-protein coupled receptors and C-terminal phospholipid kinase domains. *mBio* 9 (1): e02119-17. DOI:10.1128/mBio.02119-17.
- van den Hoogen, D.J. & Govers, F. (2018) GPCR-bigrams: enigmatic signaling components in oomycetes. *Plos Pathogens* 14(7): e1007064. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007064>
- van den Hoogen, D. J. (2018) Dissecting cellular signalling in *Phytophthora*. PhD thesis, WU Wageningen, The Netherlands. 144 pp. <http://dx.doi.org/10.18174/447045>

- Vleeshouwers, V.G.A.A., Raffaele, S., Vossen, J.H., Champouret, N., Oliva, R., Segretin, M.E., Rietman, H., Cano, L.M., Lokossou, A., Kessel, G., Pel, M.A. & Kamoun, S. (2011) Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors. *Annu Rev Phytopathol*, 49, 507-531.
- Wang, Y. & Bouwmeester, K. (2017) L-type Lectin Receptor kinases; new forces in plant immunity. *PLoS Pathogens* 13(8): e1006433. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006433>
- Wang, Y, Tyler, B.M. & Wang, Y. (2019) Defense and counterdefense during plant-pathogenic oomycete infection. *Annual Review of Microbiology* 73, 667-696.
- Whisson SC, Boevink PC, Wang S, & Birch PR.J. (2016). The cell biology of late blight disease. *Current Opinion in Microbiology* 34, 127-135.



INTERNATIONAL YEAR OF
PLANT HEALTH
2020