

# Phylogeny and taxonomy of *Phaeoacremonium* and its relatives

Lizel Mostert

Op 23 juni 2006 promoveerde Lizel Mostert aan Wageningen Universiteit op het proefschrift getiteld 'Phylogeny and taxonomy of *Phaeoacremonium* and its relatives'. Promotor was Prof. Dr. P.W. Crous verbonden aan de leerstoelgroep Fytopathologie, Wageningen Universiteit. Co-promotor was Dr. E.C.A. Abeln van het Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.

## Inleiding

*Phaeoacremonium* soorten zijn bekende ziekteverwekkers van houtachtige vaatplanten, die verdorring en afsterving van hun gastheren veroorzaken. De belangrijkste ziektes waarin zij een rol spelen zijn Petri ziekte en 'esca' (Fig. 1), welke voorkomen op wijnstokken en worden veroorzaakt door een complex van schimmels waaronder *Phaeomoniella chlamydospora* en diverse soorten van *Phaeoacremonium*. In dit proefschrift werd door middel van morfologie, kruisingsproeven en DNA analyse bevestigd dat het geslacht *Togninia* de teleomorph van *Phaeoacremonium* is. Hiertoe werden de anamorphen van *Togninia minima*, *T. fraxinopennsylvanica* en *T. novae-zealandiae* morfologisch vergeleken met *Pm. aleophilum* (Fig. 2), en representatieve cultures werden gekruist in alle combinaties. Inter-specifieke kruisingen waren nooit fertiel. Kruisingen tussen isolaten van *Pm. aleophilum* leverden een *Togninia* (Fig. 3) teleomorph op. Om de phylogenetische verwantschappen tussen *Phaeoacremonium* en *Togninia* soorten vast te stellen, werden de

ITS en het EF-1 $\alpha$  gen van de isolaten geanalyseerd. De plaatsing van de teleomorphs binnen *Togninia* (*Calosphaeriales*) werd bevestigd door phylogenetische analyses van het 18S small subunit (SSU) rRNA. *Togninia minima* bleek de teleomorph van *Pm. aleophilum* te zijn en een bi-allelic heterothallic voortplantingssysteem te hebben. Om de naam *T. minima* eenduidig vast te leggen zijn zowel een epitype als teststammen voor de mating types aangewezen.

## *Phaeoacremonium* als humaan pathogeen

Een aantal soorten van *Phaeoacremonium* komen als oppor-

tunisten ook voor bij mensen en veroorzaken dan *phaeohyphomycosis*. Negen nieuwe soorten *Phaeoacremonium* konden worden geïdentificeerd, waarvan er zes waren geïsoleerd uit menselijke infecties. De nieuwe soorten zijn: *Pm. alvesii*, *Pm. amstelodamense*, *Pm. australiense*, *Pm. griseorubrum*, *Pm. krajdennii*, *Pm. scolyti*, *Pm. subulatum*, *Pm. tardiscrecens* en *Pm. venezuelense*. Ze kunnen worden onderscheiden d.m.v. 'culturele' en morfologische kenmerken en op basis van phylogenetische analyse van partiële sequenties van actine,  $\alpha$ -tubuline en calmoduline genen. Een polyfasische elektronische sleutel gebaseerd op morfologische, culturele en  $\alpha$ -tubuline sequentiedata werd ontwikkeld om routinematige identificatie van species mogelijk te maken. Deze database kan online worden geraadpleegd via <http://www.cbs.knaw.nl/phaeoacremonium.htm>. Vier soorten zijn zowel geïsoleerd uit menselijke patiënten als uit

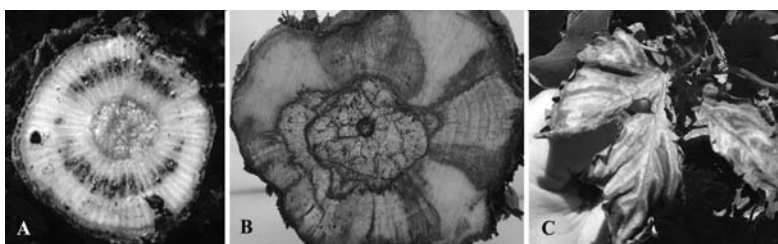


Figure 1. Symptoms associated with Petri disease (A) and esca (B, C). A. Black spots visible on rootstock of a one-yr-old vine. B. Cross-section showing wood discoloration of an 18-yr-old vine. C. 'Tiger stripe' patterns on the leaves. Photographs B by F. Halleen and C by L. Morton.

houtachtige planten waar deze schimmels zich van nature ophouden. Na herdentificatie bleken alle isolaten die voorheen waren geïdentificeerd als *Pm. inflatipes* en werden geassocieerd met menselijke ziekte, verkeerd te zijn geïdentificeerd en te behoren tot nieuwe taxa.

## Monografie van het geslacht *Togninia* en zijn *Phaeoacremonium* anamorphen

Tien soorten van *Togninia* en 22 van *Phaeoacremonium* worden geaccepteerd, waaronder zes nieuwe soorten in *Togninia* (*T. argentinensis*, *T. austroafricana*, *T. krajdenii*, *T. parasitica*, *T. rubrigena* en *T. viticola*) en zes in *Phaeoacremonium* (*Pm. argentinense*, *Pm. austroafricanum*, *Pm. novae-zealandiae*, *Pm. iraniana*, *Pm. sphinctrophorum* en *Pm. theobromatis*). Het soortconcept is gebaseerd op morfologische kenmerken en wordt ondersteund door DNA data (partiële sequenties van de actine en  $\beta$ -tubuline genen). Phylogenieën op basis van de SSU en LSU rRNA genen werden gebruikt om vast te stellen dat *Togninia* meer verwant is aan de Diaporthales dan aan de *Calosphaeriales*. Onderzoek van de 'type specimens' toonde aan dat *T. cornicola*, *T. vasculosa*, *T. rhododendri*, *T. minima* var. *timidula* en *T. villosa* niet tot *Togninia* behoorden. Daarom worden de volgende nieuwe combinaties voorgesteld: *Calosphaeria cornicola*, *Calosphaeria rhododendri*, *Calosphaeria transversa*, *Calosphaeria tumidula*, *Calosphaeria vasculosa* en *Jattaea villosa*.

## Identificatie van *Phaeoacremonium*

Het correct en snel identificeren van *Phaeoacremonium* species is belangrijk om hun betrokkenheid in planten- en menselijke ziekten beter te kunnen begrijpen. Een snelle identificatiemethode werd ontwikkeld voor de 22 erkende soorten van *Phaeoacremonium*. Hiertoe werden 23 soort-specifieke primers ingezet, waarvan twintig primers voor het  $\beta$ -tubuline gen en drie voor het actine gen. Deze primers kunnen worden gebruikt in veertien multiplex reacties. De polyfasische elektronische sleutel werd aangevuld met de gegevens van de nieuwe soorten. Daarnaast zijn dichotome sleutels beschikbaar voor de identificatie van de *Togninia* en *Phaeoacremonium* soorten, die op fenotypische kenmerken zijn gebaseerd. Tenslotte zijn ook sleutels voor de identificatie van *Phaeoacremonium*-achtige schimmels en de genera verwant aan *Togninia* gemaakt.

## Voortplanting, genetische diversiteit en verspreiding

De voortplantingsstrategie van diverse *Togninia* species werd onderzocht met ascosporen verkregen uit de vruchtbare perithecia die *in vitro* waren geproduceerd. *Togninia argentinensis* en *T. novae-zealandiae* zijn homothallisch, terwijl *T. austroafricana*, *T. krajdenii*, *T. parasitica*, *T. rubrigena* en *T. viticola* heterothallisch zijn. De soorten die hoofdzakelijk geïsoleerd werden uit zieke wijnranken zijn *Pm. aleophilum*, *Pm.*

*parasiticum*, en *Pm. viticola*. Perithecia van twee van deze soorten, *T. minima* en *T. viticola*, werden gevonden op wijnranken in het veld hetgeen aantoont dat deze soorten recombineren in wijngaarden. De genetische diversiteit onder isolaten van *Pa. chlamydospora* op wijnranken werd vervolgens onderzocht door middel van Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs). Isolaten van *Phaeoacremonium chlamydospora* werden verkregen van verschillende plekken op dezelfde rank, verschillende ranken in een wijngaard en uit verschillende wijngaarden in Zuid-Afrika. Geselecteerde isolaten van diverse druivenproducerende landen, namelijk Australië, Frankrijk, Italië, Iran, Nieuw Zeeland, Slovenië en de Verenigde Staten van Amerika, werden ook in het onderzoek betrokken. Omdat er over het algemeen weinig genetische variatie werd gevonden, werd bevestigd dat asexuele reproductie dominant is. Er werden verschillende genotypes gevonden onder de isolaten van *Pa. chlamydospora* op dezelfde

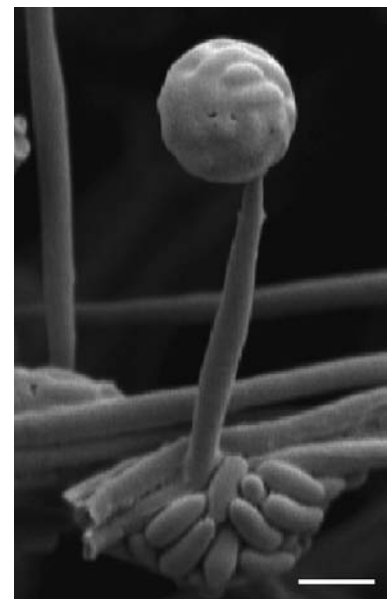


Figure 2. Phialide with conidia of *Phaeoacremonium aleophilum*. Scale bar = 5  $\mu$ m.

wijnrank, hetgeen suggereert dat er meerdere infecties hebben plaatsgevonden vanuit verschillende bronnen. Isolaten uit verschillende landen hadden een hoog percentage overeenkomst en clusterden samen, wat wijst op afwezigheid van genotype-geografische structuur. De aanwezigheid van hetzelfde genotype in verschillende wijngaarden en productiegebieden suggereert dat lange-afstand verspreiding door de lucht of door transport van geïnfecteerd plantmateriaal een belangrijke rol speelt in de verspreiding.

### Conclusies en vooruitblik

Zeven nieuwe soorten van *Togninia* en vijftien van *Phaeoacremonium* werden beschreven. De nieuwe gegevens en de

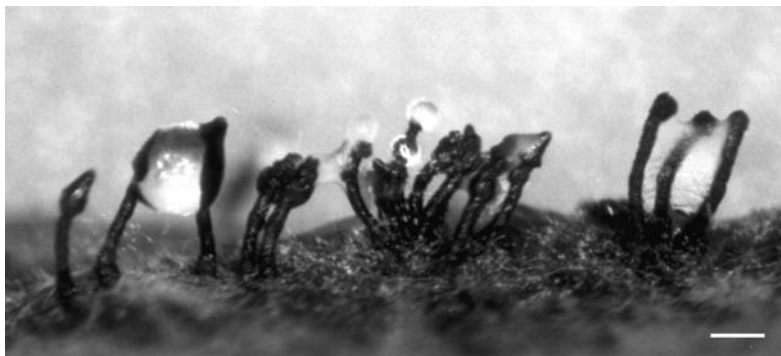


Figure 3. Long necked perithecia of *Togninia minima*. Scale bar = 500  $\mu$ m.

nieuw ontwikkelde dichotome en online polyphasische sleutels, stellen wetenschappers in staat om alle bekende soorten correct te identificeren en vormen een referentie-database waaraan in de toekomst nieuwe soorten kunnen worden toegevoegd. De nieuwe beschreven gastheervariatie en verspreidingspatronen, tezamen met de beschreven ziekteverschijnselen, zullen wetenschappers in staat stellen om

die soorten te identificeren waarvoor mogelijk quarantaine-maatregelen moeten worden getroffen. Snelle identificatie van deze soorten, gebaseerd op de data die in dit proefschrift zijn beschreven, zou kunnen voorkomen dat geïnfecteerd wijnrankmateriaal wordt geïmporteerd in landen waar de soort momenteel niet voorkomt.

PROMOTIES