

Moleculaire manipulatie van oömyceten

F. Govers

Laboratorium voor Fytopathologie, Wageningen Universiteit en onderzoekschool Experimentele Plantenwetenschappen, Binnenhaven 9, 6709 PD Wageningen.

Phytophthora en *Pythium* soorten behoren tot de klasse der oömyceten, afdeling oömycota, en staan evolutionair gezien ver verwijderd van de hogere schimmels uit de afdelingen ascomycota en de basidiomycota. Begin jaren negentig is een begin gemaakt met het ontwikkelen van methoden ten behoeve van moleculair-genetisch onderzoek aan oömyceten, in het bijzonder aan *Phytophthora infestans*, de veroorzaker van de aardappelziekte.

Ons onderzoek richt zich op het ontrafelen van de interactie tussen plant en pathogeen op moleculair en cellulair niveau. Om te kunnen onderzoeken waarom *P. infestans* pathogeen is op aardappel en tomaat, en hoe *P. infestans* in sommige aardappelcultivars en in niet-waardplanten afweerreacties induceert, isoleren en karakteriseren wij genen uit *P. infestans* die direct of indirect verantwoordelijk zijn voor de synthese van pathogeniteitsfactoren en elicitors. Met behulp van gerichte mutagenese kan onderzocht worden in hoeverre deze genen cruciaal zijn voor pathogenese of voor het induceren van afweerreacties.

Dat gerichte mutagenese mogelijk is in *P. infestans* is aangetoond met het *inf1* gen. *Inf1* codeert voor een 10 kDa extracellulair eiwit, het elicotine INF1. Elicitines zijn elicitors die in soorten uit het geslacht *Nicotiana* een overgevoeligheidsreactie induceren. Er wordt verondersteld dat elicities de waardplantenreeks van *Phytophthora* beperken. Om te onderzoeken of INF1 fungeert als een avirulentiefactor die in *Nicotiana* resistentie induceert tegen *P. infestans*, hebben wij gerichte mutagenese uitgevoerd door *P. infestans* te transformeren met *inf1* constructen in 'sense' en anti-sense' oriëntatie. Op die manier werden verschillende INF1 deficiënte stammen verkregen. Deze stammen zijn nog steeds pathogeen op aardappel maar kunnen, in tegenstelling tot wildtype *P. infestans* stammen, ook sporulerende lesies vormen op *Nicotiana benthamiana*. Hiermee is het bewijs geleverd dat herkenning van het elicitoreiwit INF1 een cruciale rol speelt in de resistentie van *N. benthamiana* tegen *P. infestans* (Kamoun *et al.* 1998 Plant Cell **10**, 1413-1425).

Bij onderzoek naar het *in planta* geïnduceerde gen *ipiO*, werd de activiteit van de *ipiO*-promoter onderzocht door *P. infestans* te transformeren met een construct waarin de *ipiO*-promoter gefuseerd is aan het GUS reporter gen. Hieruit bleek dat *ipiO* tijdens infectie specifiek tot expressie komt in de tip van hyfen die

de plantencellen binnendringen hetgeen wijst op een rol voor IPI-O in de pathogenese (van West *et al.* 1998 Fungal Genetics and Biology **23**, 126-138). Tot dusver is GUS het enige reporter gen waarvan aangetoond is dat het werkzaam is in oömyceten.

Om fysiso-specifieke elicitors van *P. infestans* te karakteriseren willen we de betreffende genen, *avr* genen, isoleren met behulp van positionele clonering. Op basis van AFLP merkers werd een moleculair-genetische koppelingskaart van *P. infestans* geconstrueerd (van der Lee *et al.* 1998 Fungal Genetics and Biology **21**, 278-291). Momenteel wordt gericht zocht naar AFLP merkers die sterk gekoppeld zijn aan *avr* genen en deze zullen gebruikt worden om *avr* genen te isoleren.

Detection of *Phytophthora* species with the *Rhododendron* leaf test

K. Themann¹ and S. Werres²

¹ Institut für Mikrobiologie der Universität Braunschweig, Konstantin-Uhde-Str. 5, D - 38106 Braunschweig

² Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz im Gartenbau, Messeweg 11/12, D - 38104 Braunschweig

Fungus-like microorganisms of the genus *Phytophthora* are important soil-borne pathogens in horticulture and on trees and shrubs. *Phytophthora* species can cause for example root rot, collar rot, twig blight and fruit rot. Disease development can be slow especially in woody plants and very often symptoms develop long after infection has taken place. Up to now diagnosis for infection with *Phytophthora* species has mainly been done by visual assessment of disease symptoms and by microbiological examination. Both methods are not very successful for detecting latent infections especially in voluminous and woody root systems. To lower the risk that *Phytophthora* species are spread by latently infected plants, easy to handle methods for routine screening of plant material, of soil before planting and for the examination of recycling water in nurseries and hydroponic systems are necessary.

Diagnostic techniques which are very easy to handle are bait tests. In experiments *Rhododendron* leaves of the cultivar *R. catawbiense* 'Cunningham's White' have been proved to be a very attractive bait for *Phytophthora* species. For baiting 200 ml of root pieces of about 2 cm in length or 200 ml soil or 400 ml water were filled into a plastic container (size: 11.5 x 18.5 x 5 cm). To the root and the soil samples 400 ml deionised water was added. Then 5 freshly picked *Rhododendron* leaves we-