

# Phoma barcoding: De volgende fase in taxonomisch onderzoek in een complex schimmelgeslacht

Maïkel Aveskamp<sup>1</sup>, Hans de Gruyter<sup>2</sup>, Gerard Verkley<sup>1</sup> en Pedro Crous<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Centre, Uppsalaalaan 8, Postbus 85167, 3508AD Utrecht

<sup>2</sup> Plantenziektenkundige Dienst, Postbus 9102, 6700 HC Wageningen

ARTIKEL

## Samenvatting

Met het verschijnen van de 'Phoma Identification Manual' in 2004 is er een tijdperk afgesloten in het *Phoma* onderzoek in Nederland. Met de introductie van moleculaire technieken dient zich een nieuwe fase aan. Een hernieuwd onderzoek is recentelijk opgestart door het Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) en de Plantenziektenkundige Dienst (PD), en is gericht op fylogenetische vraagstukken zowel binnen het geslacht *Phoma* als tussen dit genus en verscheidene gerelateerde genera onderling. Daarnaast zullen de moleculaire data dienen als basis voor het ontwikkelen van soortspecifieke DNA-barcodes. Deze barcodes vormen de basis voor een nieuwe generatie moleculaire identificatie- en detectietechnieken voor belangrijke plantpathogene *Phoma* soorten.

## Inleiding

Het aseksuele schimmelgeslacht *Phoma* bestrijkt een grote groep schimmels, die - op

een enkele uitzondering na - allen kunnen overleven op plantmateriaal. Ongeveer de helft van de tot nu toe beschreven taxa zijn daadwerkelijk plantpathogeen te noemen. Hieronder bevinden zich een groot aantal waardplant-specifieke pathogenen. Bekende voorbeelden hiervan zijn *P. foveata*, de veroorzaker van gangreen bij aardappel, *P. tracheiphila*, verantwoordelijk voor *mal secco* in citrus en *P. lingam*, die kankerstronken veroorzaakt bij een aantal koolsoorten. De schade die wordt aangericht door laatstgenoemde schimmel is aanzienlijk; in Noordwest Europa wordt er jaarlijks uitgegaan van 5-20% opbrengstderving (Fitt *et al.*, 2006). Verder kent het geslacht een tiental quarantaine-organismen, welke grote financiële beperkingen opleggen aan de mondiale handel. Van de resterende helft van de soorten in dit geslacht staat de meerderheid bekend als zwaktepathogeen of heeft een volledige saprotrofe levenswijze, hoewel er ook enkele soorten voorkomen die bekend staan als pathogeen van hogere organismen, waaronder de mens.

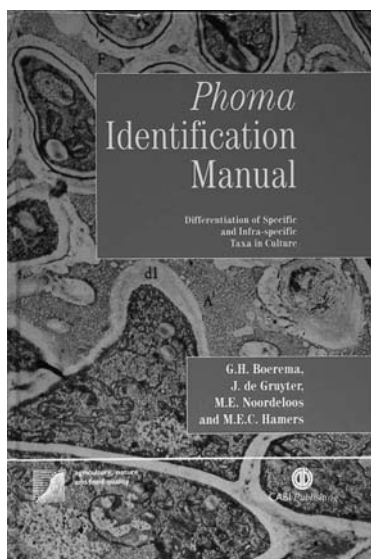
De scheidslijn tussen de zwaktepathogenen en de schadelijke soorten is niet altijd even duidelijk. Zo is er, zelfs door een geoefend oog, nauwelijks onderscheid te maken tussen de eerder genoemde *P. foveata* en de wijdverspreide, maar ongevaarlijke *P. exigua* var. *exigua* op basis van morfologische kenmerken. Pas recentelijk zijn twee soorten onderscheiden binnen *P. lingam*: een agressieve, en een veel minder gevaarlijke soort die op dit moment nog geen anamorfe naam kent (Shoemaker and Brun, 2001). Binnen dit project wordt getracht het geslacht *Phoma* beter te typeren, en een niet-morfologische methode te ontwikkelen voor een snellere en preciezere identificatie van deze complexe groep schimmels.

## Taxonomie

De eerste beschrijvingen van schimmels uit het geslacht *Phoma* dateren van het begin van de negentiende eeuw, maar de officiële oprichting van *Phoma* als anamorf geslacht vond echter pas plaats in

1880. De taxonomische criteria voor het genus lieten echter te wensen over. In principe voldeed iedere schimmel met nagenoeg kleurloze, ongesepeteerde conidia hieraan, mits deze gevormd werden in pycnidia op plantenstengels(!). Deze onduidelijke criteria leverden veel verwarring op en mede door het idee dat elke plantensoort zijn 'eigen' *Phoma* had (zogenoemd waardplantgeassocieerde nomenclatuur), was er in 1884 al sprake van 634 soorten (Saccardo, 1884). Gedurende de jaren daarna groeide het aantal taxa verder, met als hoogtepunt de jaren dertig, toen er bijna drieduizend 'soorten' stonden beschreven.

De omslag kwam medio vorige eeuw vanaf het moment dat morfologische kenmerken *in vitro* belangrijker werden geacht dan kenmerken op plantmateriaal. Daarnaast hebben de kenmerken betreffende de conidiogenese de taxonomische wetenschap nieuwe inzichten verschaft over *Phoma* en aanverwante genera (Sutton, 1964).



Figuur 2. De *Phoma* Identification Manual, geschreven door medewerkers van de Plantenziektenkundige Dienst, is momenteel het standaardwerk binnen het mondiale *Phoma* onderzoek.

Sinds de jaren zestig zijn medewerkers van de PD de trekkers geweest van vernieuwend onderzoek naar de taxonomie van dit schimmelgeslacht en zijn vele taxa voor het eerst met behulp van cultuurkenmerken gekarakteriseerd. Mede door het opstellen van een nieuw genusconcept (Boerema en Bollen, 1975) is het aantal soorten binnen dit geslacht drastisch teruggebracht. Daarnaast zijn soorten die eerder in andere genera beschreven waren, nu veelal als synoniem in *Phoma* geïdentificeerd. Op basis van morfologische gegevens *in vitro*, zijn door Boerema (1997) negen secties in *Phoma* onderkend (Tabel 1). De vraag is nu in hoeverre er een genetische basis is voor de gehanteerde indeling in secties. Sommige secties lijken inderdaad gebaseerd op morfologische kenmerken die een evolutionaire verwantschap verraden of hebben een specifieke teleomorf-relatie (Tabel 1). Evolutionaire verwantschappen binnen de andere secties zullen echter met behulp van moleculaire fylogenie onderzocht moeten worden.

De resultaten van het onderzoek bij de PD hebben geleid tot een reeks publicaties met determinatiesleutels en beschrijvingen van 223 *Phoma* soorten en -variëteiten binnen deze secties. Deze gegevens zijn in volledig herziene vorm gebundeld in een handboek (Boerema *et al.*, 2004).

## ***Phoma* identificatie**

Hoewel veel *Phoma* isolaten aan de hand van de kenmerken in culture kunnen worden geïdentificeerd, zijn nog lang niet alle soorten bekend of *in vitro* bestudeerd. Veel soorten zijn niet eenduidig in te delen in de eerder genoemde secties en on-

volledige expressie van morfologische kenmerken bemoeilijkt vaak de identificatie. Tussen de soorten is tevens een overlap van kenmerken mogelijk, waardoor plaatsing van een isolaat bemoeilijkt wordt. Daarnaast is komen vast te staan dat een aantal *Phoma* soorten heterogeen is en bestaat uit meerdere cryptische taxa, die morfologisch niet tot nauwelijks te onderscheiden zijn, maar waarvoor detectie kritiek is in verband met de waargenomen verschillen in pathogeniciteit, zoals binnen het *P. exigua* complex. Zelfs de typesoort van het geslacht, *P. herbarum*, lijkt een complex van dergelijke cryptische taxa te zijn (Bridge *et al.*, 2004). Verder wordt de identificatie bemoeilijkt doordat *Phoma* veelal enige gelijkenissen vertoont met enkele andere asexuele geslachten, waaronder Ascochyta, Phyllosticta, Pyrenochaeta en Pleurophoma. Ook het voorkomen van vele synanamorfen en de associatie met meerdere teleomorfe geslachten draagt niet bij tot een helder begrip van dit geslacht.

Het isoleren en op morfologische kenmerken identificeren van *Phoma* isolaten is een tijdrovend en arbeidsintensief proces en kan alleen goed worden uitgevoerd door getraind personeel. De instanties die zijn belast met het beoordelen van plantmateriaal aan de grens staan onder hoge tijdsdruk en beschikken veelal niet over voldoende kennis en ervaring om *Phoma*'s correct te identificeren. Geëxporteerd materiaal wordt regelmatig afgekeurd terwijl er wellicht alleen sprake is van besmetting met onschadelijke opportunisten, die worden aangezien voor quarantaine-organismen of andere potentieel schadelijke pathogenen, met grote financiële schade voor de betrokken sector als gevolg. Om de aard van

de besmetting accuraat te kunnen toetsen, is een snelle en objectieve methode nodig, die minder afhankelijk is van genexpressie en menselijke interpretatie. Hierbij kunnen moleculaire technieken van grote waarde zijn. Momenteel zijn er echter nog slechts enkele DNA-identificatiesystemen voor schimmels beschikbaar (Grauwet *et al.*, 2004), en daarin zijn nog geen *Phoma* soorten opgenomen. Er is dan ook nog maar nauwelijks DNA onderzoek gedaan aan *Phoma*. Een eerste, noodzakelijke stap voor de ontwikkeling van een DNA-identificatiesysteem voor *Phoma* wordt in dit project genomen middels het ontwikkelen van DNA-barcodes.

### DNA-barcoding

Schattingen lopen ver uiteen, maar over het algemeen wordt er aangenomen dat de aardbol ongeveer vijftienmiljoen soorten organismen kent. Deze soorten zijn, volgens de ideeën van de moleculaire biologie, allemaal van elkaar te onderscheiden door een eigen, specifieke genetische code. Een dergelijke soorteigen code zou in principe niet lang hoeven te zijn; met een lengte van slechts 15-25 basen (welke elk uit vier nucleotiden kunnen bestaan) overtreft het aantal mogelijke sequenties het geschatte aantal

soorten ruimschoots (Hebert *et al.*, 2003; Summerbell *et al.*, 2005). Het karakteriseren van soorten met hun specifieke sequenties heet DNA-barcoding, naar analogie met de streepjescodes op producten in winkels: elk type product heeft zijn eigen unieke streepjescode en elk kan met een (kassa-)scan vlug geïdentificeerd worden. De bedoeling van DNA-barcoding is dan ook om uiteindelijk de coderingen te gebruiken voor vlotte en eenvoudige identificatie van biologisch materiaal. Hierbij kan onder meer gedacht worden aan soortspecifieke probes binnen een Taq-Man PCR of een microarray. Veel genoemde, mogelijke toepassingen van een dergelijk systeem zijn medisch onderzoek, ecologisch veldwerk en inspecties van plantmateriaal door keuringsinstanties.

### Het onderzoek

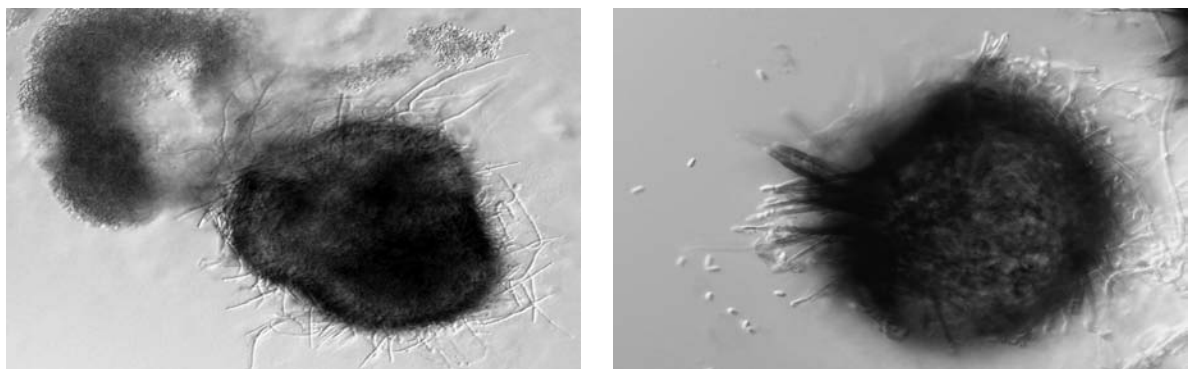
Het uitgebreide onderzoek aan *Phoma* in Nederland heeft zijn sporen nagelaten; momenteel bevinden zich in de collecties van het CBS en de PD meer dan twaalfhonderd goed gedocumenteerde *Phoma* stammen. Daarnaast beschikken beide collecties nog over enige honderden stammen van aanverwante genera. Deze, en andere stammen uit buitenlandse collecties zullen worden aan-

gewend in het recent opgestarte vervolgonderzoek.

Met de opkomst van moleculaire technieken is het mogelijk geworden om grote hoeveelheden taxonomische informatie in relatief korte tijd te verkrijgen. Getracht wordt om van bovengenoemde stammen sequenties van meerdere loci te genereren, en de verkregen data te combineren met morfologische en culturekenmerken. Met deze gegevens kan een fylogenie van het geslacht *Phoma* worden bepaald, welke gebruikt zal worden om de volgende kernvragen te beantwoorden:

- Is het gemaakte onderscheid tussen *Phoma* en andere eerder genoemde verwante anamorfe genera juist of dient het genusconcept aangepast te worden?
- Is de onderverdeling van het geslacht in secties juist, gezien vanuit een evolutionair perspectief?
- Kan er een eenduidige link worden gelegd met de verschillende gerelateerde teleomorfen en synanamorfen van *Phoma*?
- Kunnen er binnen de diverse heterogene soorten meerdere cryptische taxa herkend worden?

Deze fylogenetische informatie kan van grote betekenis zijn bij de karakterisering van zowel schadelijke als non-pathogene *Phoma* soorten en de ontwik-



Figuur 1. Pycnidia van *P. typhina* (l) en *P. gardeniae* (r).

Tabel 1. De negen secties die binnen *Phoma* onderscheiden worden, hun type-soorten en de geassocieerde teleomorfen voor zover deze bekend zijn.

Sectie	Type-soort	Teleomorf
<i>Heterospora</i>	<i>P. heteromorphospora</i>	-
<i>Macrospora</i>	<i>P. zae-maydis</i>	<i>Didymella</i>
<i>Paraphoma</i>	<i>P. radicina</i>	-
<i>Peyronellaea</i>	<i>P. glomerata</i>	-
<i>Phoma</i> (sect.)	<i>P. herbarum</i>	<i>Didymella</i>
<i>Phyllostictoides</i>	<i>P. exigua</i> var. <i>exigua</i>	<i>Didymella</i>
<i>Pilosa</i>	<i>P. betae</i>	<i>Pleospora</i>
<i>Plenodomus</i>	<i>P. lingam</i>	<i>Leptosphaeria</i>
<i>Sclerophomella</i>	<i>P. complanata</i>	<i>Didymella</i>

keling van effectievere bestrijdingsmethoden. De gevonden sequenties zullen daarnaast gebruikt worden bij het onderzoek naar DNA-barcodes. Hiermee wordt de ontwikkeling van een snelle identificatiemethode beoogd, welke tot op soort- of variëteitsniveau onderscheid kan maken tussen quarantaine-organismen en extreem schadelijke *Phoma* soorten enerzijds en zwakteparasieten en saprophyten anderzijds. Hieruit volgend kunnen er detectiemethoden ontwikkeld worden om direct vanuit een plant-, grond-, of watermonster aanwezigheid aan te tonen van meerdere schadelijke *Phoma* soorten, om zo een snellere afhandeling van import- en exportinspecties te bewerkstelligen.

## Situationele inperking

Het nieuwe laboratorium van

de PD is dus gebaseerd op situationele inperking waarbij de biologie van het organismen het uitgangspunt is. Hierbij is zoveel mogelijk gebruik gemaakt van de synergie tussen de verschillende wet- en regelgeving (EU-richtlijn 95/44, Regeling GGO van VROM/CO-GEM, ARBO- en milieurichtlijnen) om tot een zo efficiënt mogelijke inrichting van werkprocessen en laboratoria te komen. Op deze wijze is de flexibiliteit van het werkproces behouden, maar zijn meer dan voldoende waarborgen aangebracht waardoor de risico's met betrekking tot schadelijke organismen (met name quarantaine- en quarantainewaardige organismen), GGO's, en chemische reagentia goed zijn afgedekt. Het laboratorium is op deze wijze overzichtelijk ingericht en maakt het werkproces gemakkelijk waardoor de handhaving van procedures eenvoudig en transparant is.

## Referenties

- Boerema, G.H. and Bollen, G.J., 1975. Conidiogenesis and conidial septation as differentiating criteria between *Phoma* and *Ascochyta*. *Persoonia* 8, 111-144.
- Boerema, G.H., 1997. Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) - V. Subdivision of the genus in sections. *Mycotaxon* 64, 321-333.
- Boerema, G.H., Gruyter, J. de, Noordeloos, M.E., and Hamers, M.E.C., 2004. *Phoma* identification manual. Differentiation of specific and infra-specific taxa in culture. Cabi publishing, 470pp.
- Bridge PD., Spooner, B.M., and Roberts, P.J.M., 2004. Reliability and use of published sequence data. *New Phytologist* 161, 15-17.
- Fitt, B.D.L., Brun, H., Barbetti, M.J., and Rimmer, S.R., 2006. World-wide importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* 114, 3-15.
- Grauwet, T.J.M.A., Cammue, B.P.A., and Thomma, B.P.H.J., 2004. Recente ontwikkelingen in detectie en identificatie van plantenpathogenen: van microscopie naar moleculaire diagnostiek. *Gewasbescherming* 35, 201-207.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., and deWaard, J.R., 2002. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B* 270: 313-321.
- Saccardo, P.A., 1884. *Sylloge Sphaeropsidarum et Melanconiearum omnium hucusque cognitorum* 3. 860 pp.
- Shoemaker, R.A. and Brun, H., 2001. The teleomorph of the weakly aggressive segregate of *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Botany* 79, 412-419.
- Summerbell, R.C., Levesque, C.A., Seifert, K.A., Bovers, M., Fell, J.W., Diaz, M.R., Boekhout, T., Hoog, G.S. de, Stalpers, J., and Crous, P.W., 2005. Microcoding: the second step in DNA-barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 360(1462), 1897-1903.
- Sutton, B.C., 1964. *Phoma* and related genera. *Transactions of the British Mycological Society* 47, 497-509.