

# Veertig jaar onderzoek aan de bladvlekkenziekte van tomaat

Pierre J.G.M. de Wit

Emeritus hoogleraar  
Fytopathologie,  
Laboratorium voor  
Fytopathologie, Wageningen  
Universiteit & Research

## Inleiding

Toen ik op 5 juni 2014 afscheid nam als hoogleraar Fytopathologie, had ik bijna 40 jaar onderzoek gedaan aan de schimmel *Cladosporium fulvum*, de veroorzaker van de bladvlekkenziekte van tomaat. Na mijn afstuderen in de plantenziektenkunde aan de toenmalige Landbouwhogeschool in 1974 met Biochemie, Fytopathologie en Plantenfysiologie als afstudeervakken, startte ik in september van hetzelfde jaar met mijn promotieonderzoek aan dit pathosysteem bij de vakgroep Fytopathologie.

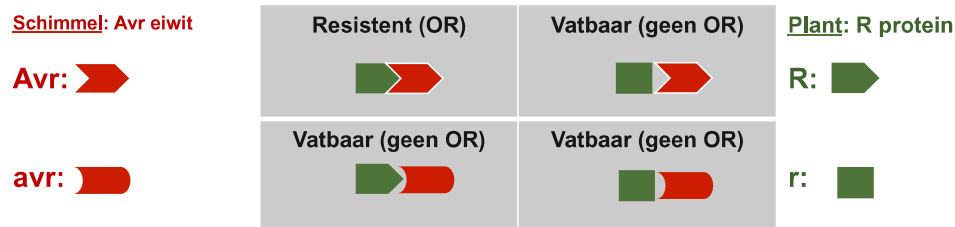
Bij de vakgroep Fytopathologie kwam in doctoraalcolleges en *capita selecta* de gen-om-gen hypothese vaak aan de orde, een hypothese opgesteld door Harold Flor in de jaren 40 van de vorige eeuw op grond van zijn onderzoek aan vlas en de vlasroestschimmel *Melampsora lini* (Flor, 1942). Minder bekend is dat professor Oort, de voorganger van professor Dekker, een vergelijkbare hypothese had opgesteld voor stuifbrand van tarwe veroorzaakt door de schimmel *Ustilago tritici* (Oort, 1944). Oorts werk werd echter niet vaak geciteerd in de literatuur omdat

hij het gepubliceerd had in het Nederlandstalige Tijdschrift over Plantenziekten, de voorganger van The Netherlands Journal of Plant Pathology, nu The European Journal of Plant Pathology. Flor toonde aan dat de vererving van resistentie in de waardplant en het vermogen van het pathogeen om de waardplant aan te tasten berust op een genenpaar: een gen in de plant, het resistentiegen (*R*) en een gen in het pathogeen het avirulentiegen (*Avr*) (Figuur 1). Planten met een specifiek *R* gen zijn resistent tegen isolaten van pathogenen met een bijpassend *Avr* gen. Ik was zeer geïnteresseerd in het onderzoek naar de genetische en biochemische basis van de gen-om-gen relatie, maar ik ben bij toeval in dit fytopathologisch onderzoek terecht gekomen. Na mijn afstuderen stond ik op het punt een contract te tekenen bij de Hogere Landbouwschool in Den Bosch (nu Hogere Agrarische School) om docent biologie en scheikunde te worden, toen professor Dekker mij een promotieplaats aanbood die ik meteen accepteerde. In die tijd waren er weinig promotieplaatsen beschikbaar en als promovendus kreeg je nog vaak de vrijheid om met een eigen onderzoeksvorstel te komen.

## Genetisch model:

Schimmel:	Plant: Resistentiegen	<i>R</i>	<i>r</i>
	Avirulentiegen		
<i>Avr</i>		Resistent	Vatbaar
<i>avr</i>		Vatbaar	Vatbaar

## Biochemisch model:



Figuur 1. Genetisch en biochemisch model voor Flors gen-om-gen hypothese.  
Afkortingen: Avr, avirulentiegen; avr, gemuteerd of afwezig avirulentiegen; OR, overvevoeligheidsreactie.

### Keuze voor het pathosysteem *Cladosporium fulvum*-tomaat

Tijdens mijn studie verschenen de eerste berichten over nevenwerkingen van het gebruik van pesticiden in de literatuur en het boek 'Silent Spring' van Rachel Carson (1962) deed alarmbellen rinkelen. Bij de vakgroep Fytopathologie werd veel onderzoek gedaan aan werkingsmechanismen van fungiciden en al snel werd duidelijk dat schimmels vroeg of laat resistentie tegen deze middelen ontwikkelden. Dus naast hun onwenselijke nevenwerkingen werden deze middelen op den duur ook onbruikbaar. Het leek mij daarom aantrekkelijker om onderzoek te gaan doen naar natuurlijke resistentie van planten tegen pathogenen. Planten en hun pathogenen hebben gedurende miljoenen jaren een gezamenlijke evolutie doorgemaakt in genocentra en daarvan zouden we gebruik kunnen maken voor de exploitatie van natuurlijke resistentie. Natuurlijke resistentie leek mij ook 'duurzamer' dan het werk aan fungiciden omdat de ontrafeling van het werkingsmechanisme en resistentiemechanisme van één bepaald fungicide geen garantie biedt voor de ontwikkeling van een nieuw beter werkend fungicide. Hiermee is niet gezegd dat natuurlijke resistentie van planten tegen pathogenen altijd duurzamer is, maar wel dat nevenwerkingen minimaal zijn. Mijn keuze viel op de bladvlekkenziekte van tomaat, niet alleen omdat dit destijds een probleem was in de tomatenteelt, maar vooral ook omdat in tomaat reeds resistentiegenen (*Cf*-genen) waren geïntroduceerd die bescherming boden tegen bepaalde fysio's van deze schimmel, terwijl een aantal *Cf*-genen ook reeds was doorbroken door enkele fysio's van deze schimmel. Stapeling van resistentiegenen zou mogelijk een oplossing kunnen bieden, maar niemand had destijds nog enig idee hoe resistentiegenen eruit zagen, en hoe een schimmel deze zou kunnen doorbreken. De gen-om-gen hypothese was reeds voor een groot aantal pathosystemen vastgesteld, vooral voor interacties tussen obligate pathogenen en hun waardplanten zoals roesten, echte en valse meeldauwen, maar ook voor biotrofe schimmels zoals *Cladosporium fulvum* die de bladvlekkenziekte van tomaat veroorzaakt. Werken met obligate parasieten was erg moeilijk omdat ze niet op kunstmatig medium gekweekt kunnen worden en het onderzoek dus aan geïnfecteerde waardplanten zou moeten plaatsvinden. *C. fulvum* parasiteert onder natuurlijke omstandigheden levende cellen van tomaat, maar kan ook op kunstmatig voedingsmedium gekweekt worden. Een ander groot voordeel was dat Ietje Boukema op het Instituut voor de Veredeling van Tuinbouwgewassen (IVT) isogene lijnen van de

tomatencultivar Moneymaker had ontwikkeld met verschillende *Cf* genen, en dat Nico Hubbeling op het Instituut voor Planteziektenkundig Onderzoek (IPO) een collectie van fysio's van *C. fulvum* had opgebouwd. Op verschillende onderzoekinstellingen in de wereld was men naarstig op zoek naar de identiteit van de *R* en *Avr* genproducten en naar de ontrafeling van resistentiereacties. Naast de accumulatie van plantenafweerstoffen met antimicrobiële activiteit (fytoalexinen), treedt na infectie van resistente planten ook vaak een overgevoeligheidsreactie (OR) op, een respons die vaak wordt waargenomen bij planten die resistent zijn tegen obligate en biotrofe pathogenen. Men was op zoek naar *Avr* factoren (nog onbekende producten van avirulente fysio's van pathogenen) die de accumulatie van fytoalexinen en de OR specifiek konden induceren in resistente maar niet in vatbare planten.

Van Dijkman en Kaars Sijpesteijn (1973) hadden reeds gepubliceerd dat lekkage van <sup>32</sup>P-gelabelde verbindingen uit tomatenbladponsjes van resistente planten na infiltratie met hoogmoleculaire verbindingen uit cultuurfiltraat van avirulente fysio's van *C. fulvum* hoger was dan na infiltratie met vergelijkbare verbindingen van virulente fysio's. De hoogmoleculaire verbindingen bestonden uit (glyco)proteïnen met een molecuulgewicht hoger dan 25 kilodalton. In de samenvatting van hun artikel concludeerden ze dat (i) de gen-om-gen relatie tussen *C. fulvum* en tomaat berust op interactie tussen specifieke schimmelproducten en membraanreceptoren van de plant die leiden tot een OR en dat (ii) deze schimmelproducten de producten van *Avr* genen zouden kunnen zijn en de membraanreceptoren de producten van de *Cf* genen.

Bij aanvang van mijn promotieonderzoek leek mij de door Van Dijkman en Kaars Sijpesteijn beschreven biotoets een uitstekende basis om de hoogmoleculaire verbindingen van virulente en avirulente fysio's nader te karakteriseren. Mijn onderzoek vond plaats in het kader van de TNO Werkgroep Interne Therapie van Planten die in 1950 was opgericht door professor Oort. Deze werkgroep had twee subgroepen, een bij de Vakgroep Fytopathologie in Wageningen en een bij het Organisch Chemisch Instituut TNO in Utrecht. Elke zes weken werden er werkbesprekingen gehouden, alternerend in Utrecht en Wageningen. Van Dijkman had na zijn promotie (van Dijkman, 1972) het instituut verlaten. Ook was enige jaren eerder Jan Raa bij het instituut gepromoveerd op vergelijkbaar onderzoek aan het pathosysteem *Venturia inaequalis*-appel (Raa, 1968) waarvoor ook de gen-om-gen relatie was vastgesteld.

### Tegenslag in mijn promotieonderzoek

In de eerste maanden van mijn promotieonderzoek probeerde ik de experimenten van Van Dijkman en Kaars Sijpesteijn (1973) te herhalen. Tomatenponsjes van isogene Cf lijnen werden gelabeld met  $^{32}\text{P}$  en hoogmoleculaire fracties uit cultuurfiltraten van verschillende avirulente fysio's werden geïnfiltreerd om vervolgens lekkage van  $^{32}\text{P}$  uit de behandelde ponsjes te meten. Mijn enthousiasme voor het gekozen onderzoeksobject verminderde toen ik de experimenten niet kon herhalen. Nadat ik over de negatieve resultaten enkele malen had gerapporteerd tijdens werkbesprekingen in Utrecht en Wageningen besloot ik met Anton van Dijkman contact op te nemen om mijn resultaten te bespreken. Dit bracht mij niet veel verder dan de conclusie van Anton van Dijkman dat werken met *C. fulvum* moeilijk was. Hij suggereerde mij contact op te nemen met Jan Raa die inmiddels werkzaam was als hoogleraar Fysiologische Microbiologie aan de Universiteit van Tromsø in Noorwegen. Na de eerste briefwisseling nodigde Jan Raa me uit om enige maanden in Tromsø te komen werken. Die uitnodiging accepteerde ik graag, en in juni 1975 ben ik samen met mijn vrouw Els naar Tromsø afgereisd waar we zeer gastvrij werden ontvangen. Ik was van plan mijn experimenten daar te herhalen, maar tot mijn grote teleurstelling werkte Jan Raa inmiddels niet meer aan *V. inaequalis*. Hij deed nu biochemisch onderzoek aan proteases en protease remmers in vis en hun effect op de houdbaarheid van vis. Omdat het laboratorium van Jan Raa beschikte over een uitstekend geoutilleerde microscopie afdeling, besloot ik een scanning electronenmicroscopisch onderzoek te starten naar de infectie van tomaat door *C. fulvum*. Het microscopisch onderzoek gaf me beter inzicht in wat er tijdens de eerste dagen na infectie gebeurt in vatbare en resistente planten. Het onderzoek leidde tot de eerste publicatie die in mijn proefschrift zou verschijnen (de Wit, 1977), maar stond ver van het vinden van een biochemische verklaring voor de gen-om-gen hypothese.

### Van aspecifieke naar fysio-specifieke elicitors

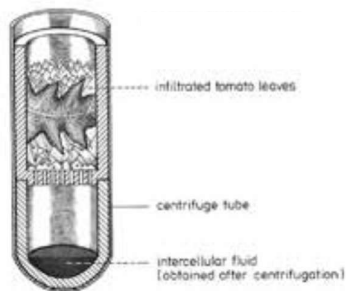
Noël Keen introduceerde de term elicitor (Keen, 1975). Een elicitor werd gedefinieerd als een component afkomstig van een pathogeen die in de waardplant fytoalexinen induceert die de kolonisatie van de plant door het pathogeen kunnen remmen. Van diverse pathogene schimmels konden elicitors geïsoleerd worden die fytoalexinen in hun waardplanten induceren zoals glyceoline

in sojaboon, phaseoline in boon, pisatine in erwten en rishitine in aardappel (Kuc, 1972). Ook van *C. fulvum* konden we elicitors isoleren die in tomaat rishitine, falcarinol en falcarindiol induceren (de Wit and Kodde, 1981a). Alle elicitors bleken echter aspecifiek en induceerden even snel en evenveel fytoalexinen in vatbare als in resistente tomatenplanten. De aspecifieke elicitors van *C. fulvum* zijn glycoproteïnen die zowel uit cultuurfiltraat als de schimmelcelwand geïsoleerd kunnen worden (de Wit & Kodde, 1981b). Toch was er indirect bewijs voor het bestaan van fysio-specifieke elicitors of fysio-specifieke suppressoren van *C. fulvum* omdat tijdens infectie sneller en meer fytoalexinen en pathogenesegelateerde (PR) eiwitten geproduceerd worden in resistente dan in vatbare tomatenplanten. Het is dus aannemelijk dat tijdens infectie van een plant, naast aspecifieke elicitors ook specifieke suppressoren geproduceerd worden door virulente fysio's van *C. fulvum* waardoor in vatbare planten afweerreacties onderdrukt worden (de Wit & Davidse, 1980). Een alternatieve verklaring kon zijn dat alleen tijdens infectie fysio-specifieke elicitors worden geproduceerd en dat de uit cultuurfiltraat geïsoleerde aspecifieke elicitors artefacten zijn die tijdens infectie van de plant niet of nauwelijks aanwezig zijn. Om deze twee hypothesen te toetsen werd intercellulaire vloeistof van *C. fulvum*-geïnfecteerde bladeren van vatbare planten geïsoleerd die geanalyseerd werd op het vermogen om de inductie van afweerreacties (fytoalexinen en OR) door aspecifieke elicitors te onderdrukken, of op de aanwezigheid van specifieke elicitors die wel in resistente, maar niet in vatbare planten afweerreacties kunnen induceren. Het laatste bleek het geval. We konden aantonen dat tijdens infectie van tomatenblad *C. fulvum* fysio-specifieke elicitors uitscheidt die herkend worden door resistente planten, maar niet door vatbare planten (De Wit & Spikman, 1982) (Figuur 2). We hadden dus bewijs voor de productie van Avr2, Avr4, Avr5 en Avr9 factoren die een OR konden induceren in tomatenplanten met het Cf-2, Cf-4, Cf-5, respectievelijk het Cf-9 gen. We konden nu met behulp van deze biotoets de Avr factoren uit intercellulaire vloeistof van geïnfecteerd tomatenblad isoleren en zuiveren.

### Identificatie van Avr factoren en klonering van Avr genen

De identificatie van Avr factoren bleek geen makkelijke opgave met de destijds beschikbare technieken. Al snel was duidelijk dat de Avr factoren eiwitten waren aangezien hun OR-inducerende activiteit teniet gedaan kon worden na

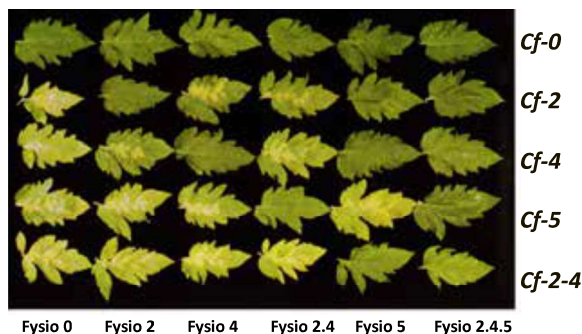
- Isolatie van intercellulaire vloeistof van *Cladosporium-fulvum*-geïnfecteerd tomatenblad



- Injectie van intercellulaire vloeistof in tomatencultivars met verschillende *Cf* genen



- Fysio-specifieke overgevoeligheidsreacties in tomatencultivars met verschillende *Cf* genen



Figuur 2. *Cladosporium fulvum* produceert fysio-specifieke elicitors tijdens infectie van tomaat.

Intercellulaire vloeistoffen van *Cladosporium fulvum*-geïnfecteerde tomatenplanten bevatten fysio-specifieke elicitors die een overgevoeligheidsreactie kunnen induceren in tomatencultivars met een bijpassend *Cf* gen (aangepast naar de Wit & Spikman, 1982).

behandeling met proteasen. Aanvankelijk werd gebruik gemaakt van klassieke scheidingstechnieken waarbij eiwitten op grootte en lading werden gescheiden. Omdat de Avr9 factor een sterke OR gaf op tomaat met het *Cf-9* gen, en de Avr9 factor tamelijk stabiel was, werd aan zuivering en identificatie van dit eiwit de hoogste prioriteit gegeven. Het eiwit bleek echter erg klein en erg moeilijk te zuiveren. De doorbraak kwam toen we van hogedruk-vloeistofchromatografie (HPLC) gebruik konden maken en voldoende zuiver Avr9 eiwit in handen konden krijgen om de aminozuurvolgorde van 20-30 aminozuren aan het N-terminale uiteinde van het eiwit te bepalen met behulp van de Edman-degradatie. De aminozuurvolgorde van het Avr9 eiwit stelde ons in staat het Avr9 gen in het genoom van *C. fulvum* op te sporen. Met behulp van een synthetisch radioactief gelabeld oligonucleotide gebaseerd op de aminozuurvolgorde werd een cDNA bibliotheek van een met *C. fulvum*-geïnfecteerde vatbare tomatenplant gescreend en een van de klonen bleek te coderen voor het Avr9 eiwit dat tijdens infectie uitgescheiden wordt door *C. fulvum* (van Kan et al., 1991). Het Avr9 eiwit wordt na uitscheiding in de intercellulaire ruimte door proteases ingekort tot een eiwit van 28 aminozuren. Avr9 was het eerste Avr gen dat ooit van een pathogene schimmel gekloneerd werd. Opvallend was dat het rijpe Avr9 eiwit 6 cysteïne residuen bevat die drie zwavelbruggen vormen waardoor het eiwit zeer compact

en stabiel is. Met behulp van NMR kon ook de tertiaire structuur van het Avr9 eiwit bepaald worden. Het behoort tot de klasse van 'cystine-knot' eiwitten (van den Hooven et al., 2001), een configuratie die veel in inhibitor-eiwitten voorkomt. Structureel lijkt het Avr9 eiwit op een proteasemremmer maar deze activiteit hebben we nooit kunnen aantonen.

Enige jaren later kon ook het Avr4 eiwit op een vergelijkbare wijze worden gezuiverd, en het coderende Avr4 gen worden gekloneerd (Joosten et al., 1994). Ook het Avr4 eiwit bleek cysteïne-rijk en het Avr4 gen wordt alleen tijdens infectie van tomaat geïnduceerd. Inmiddels werden in andere laboratoria op vergelijkbare wijze van intercellulair-groeiende pathogene schimmels Avr eiwitten geïsoleerd en hun coderende genen gekloneerd. Veel Avr eiwitten van deze schimmels bleken eveneens cysteïne-rijk te zijn, zoals de Avr eiwitten van *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* die worden uitgescheiden in het xyleem van tomaat (Rep et al., 2004).

Later werden ook het Avr2, het Avr4E en het Avr5 gen van *C. fulvum* gekloneerd met geavanceerde genom-, transcriptoom- en proteoomtechnieken (Luderer et al., 2002; Rooney et al., 2005; Westerink et al., 2004; Mesarich et al., 2014) die inmiddels ter beschikking waren gekomen. Ook deze Avr genen bleken te coderen voor kleine cysteïne-rijke Avr eiwitten. Naast de genoemde Avr eiwitten van *C. fulvum* zijn nog andere eiwitten opgespoord die

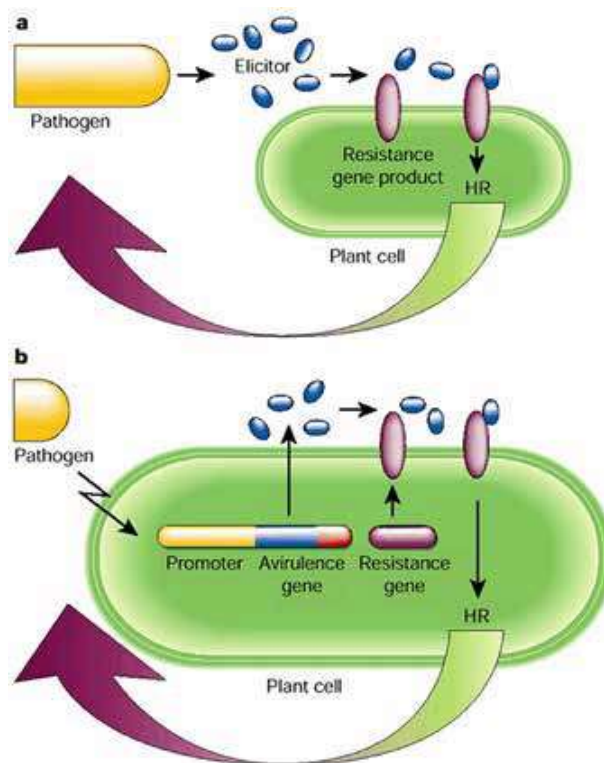


bij screening van wilde tomatenlijnen specifieke OR induceren. Deze wilde planten bezitten dus nieuwe *Cf* genen die in toekomstig veredelingsonderzoek gebruikt kunnen worden. Het onderzoek naar Avr eiwitten heeft dus een methode opgeleverd om nieuwe *R* genen op te sporen in wilde planten (Laugé et al., 2000). Uit genomonderzoek aan verschillende schimmels blijkt dat het aantal Avr eiwitten in een pathogeen varieert van enkele tientallen zoals bij *C. fulvum* tot enkele honderden zoals bij *P. infestans* (Vleeshouwers & Oliver, 2014).

### Identificatie van *Cf* genen in tomaat en *R* genen tegen ander pathogene schimmels

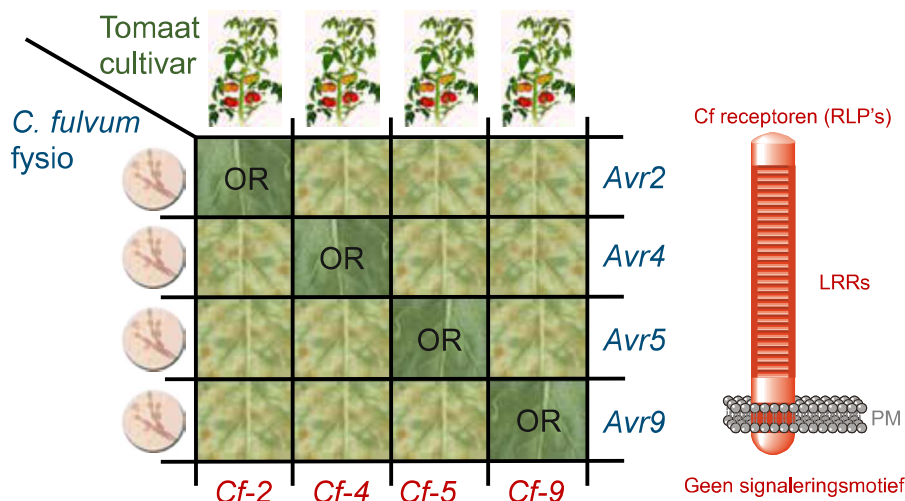
De onderzoeksgroep van Jonathan Jones op het Sainsbury Laboratorium in Norwich (UK) kon op een elegante manier, gebruikmakend van het gekloneerde *Avr9* gen en transposon mutagenese, het *Cf-9* gen in tomaat kloneren dat codeert voor

de receptor van het *Avr9* eiwit. Het *Cf-9* gen was een van de eerste schimmelresistentiegenen die gekloneerd werden in de jaren 90 van de vorige eeuw (Jones et al., 1994). Het *Cf-9* gen codeert voor een zogenaamd 'receptor-like protein' (RLP). We hebben destijds het *Avr9/Cf-9* genenpaar gepatenteerd voor het ontwikkelen van transgene planten met dit genenpaar onder controle van een pathogeen-induceerbare promotor, om ze resistent te maken tegen verschillende obligate en biotrofe schimmels (de Wit, 1990). Deze schimmels zouden bij infectie van waardplanten met deze genencassette hun eigen graf graven omdat een OR wordt geïnduceerd die verdere kolonisatie onmogelijk maakt. In die tijd werkten we nauw samen met het plantenbiotechnologiebedrijf Mogen International N.V. in Leiden om het patent met vervolgonderzoek te onderbouwen (Stuiver & Custers, 2001) (Figuur 3). Na overname van Mogen International N.V. door Zeneca en vervolgens door Syngenta raakte het patent in



Figuur 3. De genencassette. Het genereren van breed spectrum resistentie tegen biotrofe schimmels met behulp van een fysio-specifieke elicitor en bijbehorend resistentiegenproduct.

(a) de overgevoelighedsreactie (HR=OR) wordt geïnduceerd na herkenning door een resistentiegenproduct van een fysio-specifieke elicitor (geproduceerd door een Avr gen); de OR en geassocieerde afweerreacties stoppen de groei van het pathogeen. (b) Transgene plant met een genencassette die het resistentiegenproduct bevat en een bijpassend Avr gen onder controle van een promotor die aanzet wordt na infectie door biotrofe schimmels. De binnendringende schimmel zal de promotor van het Avr gen induceren en de productie van de Avr elicitor in gang zetten die in aanwezigheid van het resistentiegenproduct een OR zal induceren die de groei van de binnendringende biotrofe schimmels zal remmen.



Figuur 4. De structuur van Cf immuunreceptoren.

Cf immuunreceptoren zijn leucine-rijke repeat (LRR) receptor-like proteins (RLP's) zonder signaleringsmotief (PM: Plasmamembraan). Cf2, Cf-4, Cf5 en Cf-9 verschillen alleen in het aantal LRR's dat ze bezitten. Later is gevonden dat de Cf immuun receptoren geassocieerd zijn met receptor-like proteïne kinases SOBIR1 en BAK1 die wel een signaleringsmotief bevatten en signalen kunnen doorgeven na interactie van een Cfeiwit met een bijpassend *C. fulvum* Avr eiwit (Liebrand et al., 2013).

de 'ijskast'. De pathogeen-induceerbare promotor was de zwakste schakel van het systeem. De promotor van de genencassette mocht niet reageren op andere biologische signalen dan die van pathogenen omdat anders de plant zichzelf zou beschadigen.

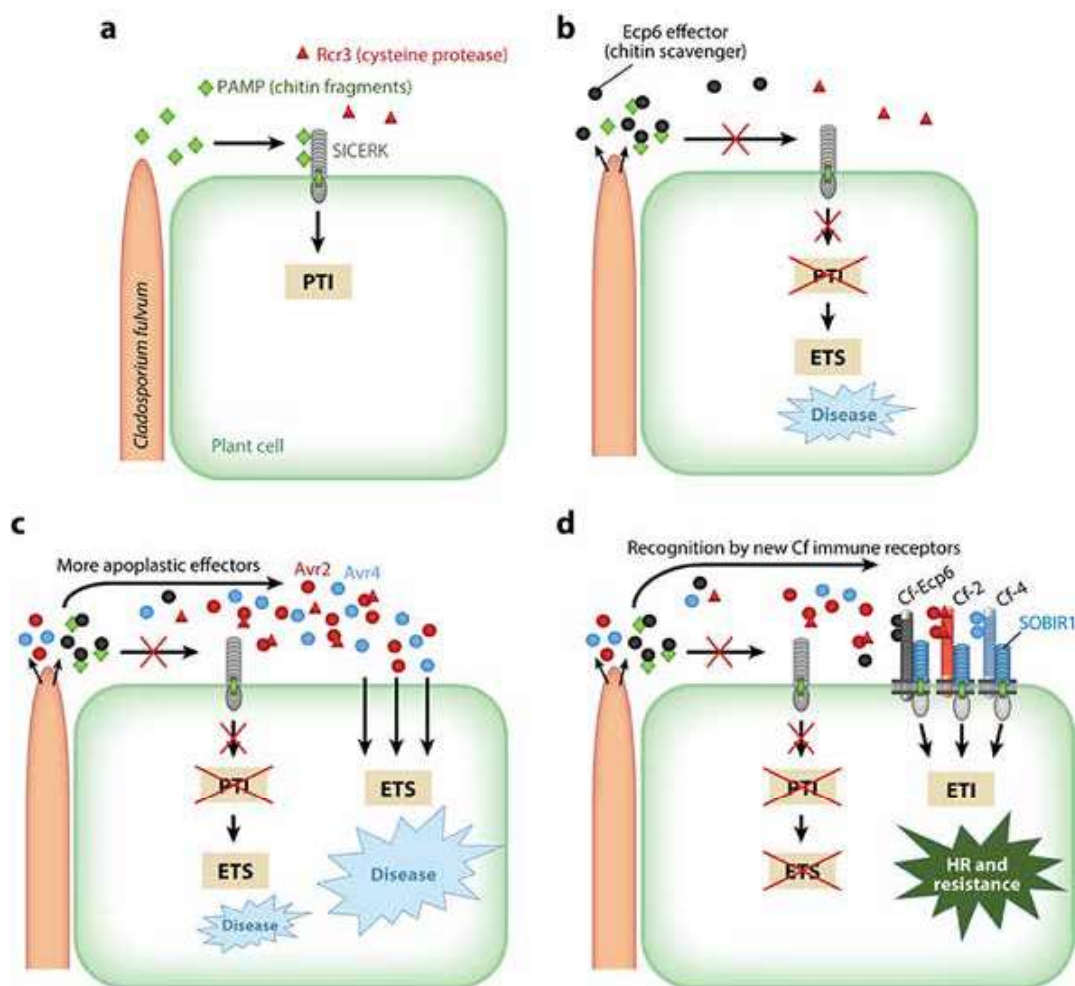
In daaropvolgende jaren werden ook de bijpassende Cf-genen met uitzondering van het Cf-4E gen gekloneerd door de groep van Jonathan Jones (Dixon et al., 1996, Thomas et al., 1997; Dixon et al., 1998; Takken et al., 1999). Alle Cf genen coderen voor RLP's met een variabel aantal leucine-rijke motieven (LRR's) (Figuur 4). Het is een klasse van membraangebonden receptoreiwitten die niet alleen van belang is voor herkenning van extracellulaire schimmelpathogenen zoals *V. inaequalis*, *F. oxysporum*, en *Leptosphaeria maculans*, maar ook resistentie kunnen geven tegen *Phytophthora infestans*. Het is opvallend dat RLP's geen signaleringsmotief bevatten dat na herkenning van de bijpassende Avr factor een cascade van afweerreacties in gang zet. Later werd gevonden dat RLP's receptor-like kinases (RLK's) rekruteren zoals SOBIR1 en BAK1 die wel het vermogen bezitten om signalen door te geven (Liebrand et al., 2013) en het afweersysteem kunnen aanschakelen (zie ook Figuur 5).

Tegen bacteriën, schimmels, oömyceten, nematoden en insecten die Avr eiwitten produceren die waardplantcellen binnendringen, coderen de bijpassende R genen voor nucleotidebindende, leucine-rijke receptoreiwitten (NB-LRR's) die in

het cytoplasma of in de kern van de waardplant zijn gelokaliseerd en daar de binnengedrongen Avr eiwitten herkennen (Jones & Dangl, 2006). NB-LRR's bezitten meestal wel een signaleringsmotief dat na interactie met het bijpassende Avr eiwit een opeenvolging van afweerreacties in gang kan zetten.

### PAMPs en effectoren: een nieuw paradigma voor plant-pathogeen interacties

Volgens de gen-om-gen hypothese worden producten van Avr genen door producten van R genen herkend waarna een OR optreedt. Maar wat is de primaire functie van Avr eiwitten voor de ziekteverwekker? De meeste planten worden beschermd tegen pathogenen door het bezit van fysische (cuticula, celwand) en chemische (fytalexinen, PR eiwitten zoals chitinases en glucanases) barrières. Slechts enkele pathogenen zijn in staat om deze barrières te doorbreken en vervolgens ook het gen-om-gen immuunsysteem dat de plant voor hen opwerpt te omzeilen. Hoewel in de loop der jaren reeds veel Avr eiwitten waren geïdentificeerd, was nog weinig bekend over hun intrinsieke functie. Een andere vraag was hoe specifieke schimmel elicitors zoals chitine,  $\beta$ -glucanen en glycoproteïnen pasten in het gen-om-gen immuunsysteem. Zoals eerder vermeld, induceren specifieke elicitors afweerreacties in alle planten ongeacht of ze wel of geen waardplant zijn voor een bepaald



Figuur 5. Schematisch overzicht van de wapenwedloop tussen *Cladosporium fulvum* en tomaat.

(a) *C. fulvum* aanwezig in de apoplast van tomaat. Het is nog geen echt pathogeen omdat tomaat zijn PAMP's (o.a. chitinefragmenten) herkent middels de chitine receptor (SICERK) waarna PTI wordt geïnduceerd. De PTI respons is niet sterk, maar sterk genoeg om *C. fulvum* onder controle te houden. (b) In een continu evolutionair proces ontwikkelt *C. fulvum* een nieuw wapen om virulenter te worden. *C. fulvum* scheidt het Ecp6 effector eiwit uit dat chitinefragmenten kan wegvangen waardoor ze geen PTI kunnen induceren. Dit geeft een zwakke vorm van effector-getriggerde vatbaarheid (ETS) met zwakke ziektesymptomen. (c) Om nog virulenter te worden scheidt *C. fulvum* nog meer effectoren uit zoals Avr2 en Avr4, waardoor de de schimmel virulenter wordt en ziektesymptomen sterker worden. (d) Dit alles zet een wapenwedloop in gang waarbij tomaat terugvecht en achtereenvolgens Cf-Ecp6, Cf-2, en Cf-4 immunreceptoren ontwikkelt die de effectoren Ecp6, Avr2 en Avr4 van *C. fulvum* herkennen en middels interactie met receptor kinase SOBIR1 (en BAK1) effector-getriggerde immuniteit (ETI) geven (aangepast naar De Wit, 2016).

pathogeen. Eerder genoemde aspecifieke elicitoren worden tegenwoordig vaak aangeduid als pathogeen-geassocieerde moleculaire patronen (PAMP's) of ook wel microbe-geassocieerde moleculaire patronen (MAMP's) omdat ze in bijna alle pathogenen en microben voorkomen en door plant en dier herkend worden door patroon herkenningsreceptoren (PRR's) die via

hun signaleringsmotief PAMP- of MAMP- getriggerde immuniteit (PTI of MTI) induceren (Jones & Dangl, 2006). PTI en MTI zijn dus toereikend voor een plant om het overgrote deel van potentiële pathogenen buiten de deur te houden. Een doorbraak in ons begrip over plant-microbe interacties kwam toen er biologische functies werden gevonden voor een aantal Avr eiwitten. Door

hun coderende genen uit te schakelen of tot overexpressie te brengen of via structuur-functie analyses van de Avr eiwitten bleek dat ze meestal het immuunsysteem van de waardplant (waaronder PTI) onderdrukken (Stergiopoulos & de Wit, 2009). Dit geldt voor Avr eiwitten van pathogene schimmels, bacteriën, oömyceten, nematoden en insecten. Bij *C. fulvum* werd gevonden dat het Avr4 eiwit chitine bindt en zo de chitine in de celwand van *C. fulvum* en andere schimmels tegen afbraak door chitinases van de waardplant beschermt (van den Burg et al., 2006). Het Avr2 eiwit van *C. fulvum* remt cysteine proteases van tomaat, waaronder Rcr3, en kan zo de afbraak van belangrijke schimmeliwitten remmen (van Esse et al., 2008). Ecp6 is een ander eiwit dat wordt uitgescheiden door *C. fulvum* dat bindt aan kleine chitine fragmenten van binnendringers om te voorkomen dat ze als PAMP's PTI kunnen induceren (de Jonge et al., 2010). De meeste Avr eiwitten zijn dus virulentiefactoren die tegenwoordig meestal effectoren genoemd worden. Tijdens de evolutie hebben planten op hun beurt receptoren ontwikkeld om deze effectoren te herkennen waarna effector-getriggerde immuniteit (ETI) geïnduceerd wordt die vaak resulteert in een OR die de kolonisatie van de plant door het pathogeen verhindert (Jones & Dangl, 2006). De *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-4E*, *Cf-5* en *Cf-9* genen van tomaat coderen voor membraanreceptoren die de Avr2, Avr4, Avr5, Avr4E en respectievelijk Avr9 effector herkennen en ETI induceren. In veel gevallen blijkt de herkenning van effectoren door R receptoren indirect te zijn. R receptoren bewaken virulentietargets van effectoren, en zodra een effector interacteert met het virulentietarget, wordt de R receptor gealarmeerd, en het afweersysteem in gang gezet. Dit is ook het geval voor de *Cf-2* receptor. Deze bewaakt het Rcr3 protease van tomaat. Zodra de Avr2 effector interacteert met Rcr3 wordt de Cf2 receptor gealarmeerd (Rooney et al., 2005). Interessant is dat de *Cf-2* receptor van tomaat multifunctioneel is en ook resistentie geeft tegen een nematode die pathogeen is op tomaat (Lozano-Torres et al., 2012). Een schematisch model voor de wapenwedloop tussen *C. fulvum* en tomaat is weergegeven in Figuur 5.

### De wapenwedloop tussen plant en pathogeen

Reeds bij aanvang van mijn promotieonderzoek was bekend dat bepaalde fysio's van *C. fulvum* *Cf*genen kunnen doorbreken. Inmiddels weten we dat dit gebeurt door mutaties in effectorgen waardoor effectoren geproduceerd worden die niet meer door bijpassende *Cf* receptoren herkend worden. Omzeiling van herkenning van

effectoren door *Cf* receptoren kan plaatsvinden door (i) verlies van een effectorgen (verlies van het *Avr9* gen in fysio's die het *Cf-9* gen omzeilen), (ii) mutaties in een effectorgen (*Avr4*) die leiden tot de inbouw van één of meer andere aminozuren in het effectoreiwit waardoor dit niet meer herkend wordt door de *Cf-4* receptor, (iii) mutaties in een effectorgen (*Avr2*) die leiden tot productie van kleinere effectoren die een bepaald domein missen waardoor ze niet meer herkend worden door de *Cf-2* receptor, of (iv) door insertie van een transposon in een effectorgen waardoor geen functioneel effectoreiwit meer geproduceerd wordt (de Wit, 2016). Hieruit zou de conclusie getrokken kunnen worden dat de inbouw van *Cf*genen in tomaat niet duurzamer is dan het gebruik van fungiciden, maar toch biedt het gebruik van *R* genen in het algemeen, en *Cf*genen in het bijzonder, meer mogelijkheden dan het gebruik van fungiciden. In de jaren 60 en 70 van de vorige eeuw werd vaak maar een enkel *Cf*gen geïntroduceerd in tomatencultivars dat redelijk snel doorbroken werd. Nu we de *Cf*genen gekloneerd hebben en weten op welke chromosomen ze liggen, kunnen door gerichte kruisingen of genetische modificatie meerdere *Cf*genen gestapeld worden in één cultivar, waardoor de schimmel zich moeilijker kan aanpassen. In de praktijk is dit ook gebeurd. De tomatenzaden die tegenwoordig op de markt worden gebracht bezitten meerdere *Cf*genen en nieuwe uitbraken van de bladvlekkenziekte komen niet vaak meer voor. Als er toch uitbraken zijn, dan blijken die meestal voor te komen bij telers die cultivars gebruiken die slechts één enkel *Cf*gen bezitten. Zo werd fysio 9 de laatste jaren regelmatig gevonden in kassen waar cultivars geteeld werden die alleen het *Cf-9* bezaten. Stapeling van *R* genen is dus een zeer efficiënte methode om de wapenwedloop tussen plant en schimmel te beteugelen (Koller et al., 2018).

### Effector-gestuurde resistentieverdeling

Tegen veel pathogene schimmels zijn voldoende *R* genen voorradig in genetische bronnen waaruit ze geïsoleerd kunnen worden door ze te screenen met effectoren. Planten die reageren met een OR bezitten hoogstwaarschijnlijk een functioneel *R* gen. Deze methode is de laatste jaren met succes toegepast om nieuwe resistentiegenen in wilde voorouders van cultuurplanten op te sporen tegen pathogenen waaronder *C. fulvum*, *F. oxysporum*, *P. infestans*, *L. maculans*, *Magnaporthe grisea* en *Verticillium dahliae* (Laugé et al., 2000; Vleeshouwers & Oliver, 2014). Ook zijn er effectoren gevonden die in meerdere pathogenen



voorkomen en gebruikt kunnen worden om *R* genen op te sporen die werkzaam zijn tegen verschillende pathogenen (Stergiopoulos et al., 2010; Lozano-Torres et al., 2012). Met behulp van nieuwe DNA technieken zoals CRISPR-Cas is het nu ook mogelijk om aangrijpingspunten van effectoren in planten gericht te muteren zodat effectoren ze niet meer herkennen en ze het immuunsysteem van de plant niet langer kunnen onderdrukken (Langner et al., 2018).

### Acceptatie van nieuwe veredelings technieken

Hoewel het stapelen van *R* genen een goed alternatief is voor het gebruik van fungiciden, is er in de maatschappij veel weerstand tegen het

gebruik van nieuwe veredelings technieken. De burger wil het liefst onbespoten voedsel en voedsel waaraan niet gesleuteld is. Het is onze taak om heldere informatie te verschaffen over de gang van zaken in de moderne landbouw. We kunnen de wereldbevolking niet meer blijven voeden zonder opbrengstverhoging en bescherming van gewassen. Cultuurmaatregelen en biologische bestrijding moeten, waar mogelijk, toegepast worden, maar ze bieden slechts in beperkte mate soelaas. *R* genen zijn beschikbaar tegen biotrofe en obligate pathogenen maar minder tegen necrotrofe pathogenen en bodempathogenen. Om onze gewassen te beschermen tegen laatstgenoemde pathogenen, zijn vaak nog bestrijdingsmiddelen nodig, maar gelukkig bezitten de moderne bestrijdingsmiddelen minder nevenwerkingen dan die in de tijd van Rachel Carson werden toegepast.

### Referenties

- Carson, R. (1962) Silent Spring. First published by Houghton Mifflin in 1962.
- De Jonge, R., van Esse, H.P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., van der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M.H.A.J. & Thomma, B.P.H.J. (2010) Conserved fungal lysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science* 329:953-955.
- De Wit, P.J.G.M. (1977) A light and scanning-electron microscopic study of the infection of tomato plants by virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 83:109-122.
- De Wit, P.J.G.M. (1981) Physiological studies on cultivar-specific resistance of tomato plants to *Cladosporium fulvum*. PhD thesis, Wageningen University
- De Wit, P.J.G.M. (1990) Method for the protection of plants against pathogens. Patent US 5866776 A.
- De Wit, P.J.G.M. & Davidse, L.C. (1980) Initiële interacties tussen plant en parasitaire schimmel; herkenning en eerste afweer. *Vakblad voor Biologen* 60:399-403.
- De Wit, P.J.G.M. & Kodde, E. (1981a) Induction of polyacetylenic phytoalexins in *Lycopersicon esculentum* after inoculation with *Cladosporium fulvum* (Syn. *Fulvia fulva*). *Physiological Plant Pathology* 18:143-148.
- De Wit, P.J.G.M. & Kodde, E. (1981b) Further characterization and cultivar-specificity of glycoprotein elicitors from culture filtrates and cell walls of *Cladosporium fulvum* (Syn *Fulvia fulva*). *Physiological Plant Pathology* 18:297-314.
- De Wit, P.J.G.M. & Spikman, G. (1982) Evidence for the occurrence of race and cultivar-specific elicitors of necrosis in intercellular fluids of compatible interactions of *Cladosporium fulvum* and tomato. *Physiological Plant Pathology* 21:1-11.
- De Wit, P.J.G.M. (2016) *Cladosporium fulvum* effectors: weapons in the arms race with tomato. *Annual Review of Phytopathology* 45: 1-23.
- Dixon, M.S., Hatzixanthis, K., Jones, D.A., Harrison, K. & Jones, J.D.G. (1998) The tomato *Cf-5* disease resistance gene and six homologs show pronounced allelic variation in leucine-rich repeat copy number. *Plant Cell* 10:1915-1925.
- Dixon, M.S., Jones, D.A., Keddle, J.S., Thomas, C.M., Harrison, K. & Jones, J.D.G. (1996) The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Cell* 84:451-459.
- Flor, H.H. (1942) Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* 32:653-669.
- Jones, D.A., Thomas, C.M., Hammond-Kosack, K.E., Balint-Kurti, P.J. & Jones, J.D.G. (1994) Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 266:789-793.
- Jones, J.D.G. & Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature* 444:323-329.
- Joosten, M.H.A.J., Cozijnsen, T.J. & De Wit, P.J.G.M. (1994) Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulence gene. *Nature* 367:384-386.
- Keen, N.T. (1975) Specific elicitors of plant phytoalexin production- determinants of race-specificity in pathogens. *Science* 187:74-75.
- Koller, T., Brunner, S., Herren, G., Hurni, S. & Keller, B. (2018) Pyramiding of transgenic Pm3 alleles in wheat results in improved powdery mildew resistance in the field. *Theoretical and Applied Genetics* 131: 861-871.
- Kuc, J., (1972) Phytoalexins, *Annual Review of Phytopathology*. 10: 207-232.
- Langner, T., Kamoun, S. & Belhaj, K. (2018) CRISPR crops: plant genome editing toward disease resistance. *Annual review of Phytopathology* 56: 479-512.
- Laugé, R., Goodwin, P.H., De Wit, P.J.G.M. & Joosten, M.H.A.J. (2000) Specific HR-associated recognition of secreted proteins from *Cladosporium fulvum* occurs in both host and non-host plants. *Plant Journal* 23:735-745.

- Liebrand, T.W.H., van den Berg, G.C.M., Zhang, Z., Smit, P., Cordewener, J.H.G., America, A.H.P., Sklenar, J., Jones, A.M.E., Tameling, W.L.L., Robatzek, S., Thomma, B.P.H.J. & Joosten, M.H.A.J. (2013) Receptor-like kinase SOBIR1/EVR interacts with receptor-like proteins in plant immunity against fungal infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:10010-10015.
- Lozano-Torres, J.L., Wilbers, R.H.P., Gawronski, P., Boshoven, J.C., Finkers-Tomczak, A., Cordewener, J.H.G., America, A.H.P., Overmars, H.A., Van 't Klooster, J.W., Baranowski, L., Sobczak, M., Ilyas, M., van der Hoorn, R.A.L., Schots, A., de Wit, P.J.G.M., Bakker, J., Goverse, A. & Smant, G. (2012) Dual disease resistance mediated by the immune receptor Cf-2 in tomato requires a common virulence target of a fungus and a nematode. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:10119-10124.
- Luderer, R., Takken, E.L.W., De Wit, P.J.G.M. & Joosten, M.H.A.J. (2002) *Cladosporium fulvum* overcomes Cf-2-mediated resistance by producing truncated Avr2 elicitor proteins. *Molecular Microbiology* 45:875-884.
- Mesarich, C.H., Griffiths, S.A., van der Burg, A., Okmen, B., Beenen, H.G., Etalo, D.W., Joosten, M.H.A.J. & de Wit, P.J.G.M. (2014) Transcriptome sequencing uncovers the *Avr5* avirulence gene of the tomato leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27:846-857.
- Oort, A.J.P. (1944) Onderzoekingen over stuifbrand. II. Overgevoeligheid van tarwe voor stuifbrand (*Ustilago tritici*) with a summary: hypersensitiveness of wheat to loose smut. *Tijdschrift over Plantenziekten* 50:73-106.
- Raa, J. (1968) Natural resistance of apple plants to *Venturia inaequalis*; a biochemical study of its mechanism. PhD thesis University Utrecht.
- Rep, M., van der Does, H.C., Meijer, M., van Wijk, R., Houterman, P.M., Dekker, H.L., de Koster, C.G. & Cornelissen, B.J.C. (2004) A small cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Molecular Microbiology* 53: 1373-1383.
- Rooney, H.C.E., Van 't Klooster, J.W., Van der Hoorn, R.A.L., Joosten, M.H.A.J., Jones, J.D.G. & De Wit, P.J.G.M. (2005) *Cladosporium Avr2* inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science* 308:1783-1786.
- Stergiopoulos, I. & de Wit, P.J.G.M. (2009) Fungal effector proteins. *Annual Review of Phytopathology* 47:233-263.
- Stergiopoulos, I., van den Burg, H.A., Okmen, B., Beenen, H.G., van Liere, S., Kema, G.H.J. & De Wit, P.J.G.M. (2010) Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:7610-7615.
- Stuiver, M.H. & Custers, J. (2001) Engineering disease resistance in plants. *Nature* 411:865-868.
- Takken, E.L.W., Thomas, C.M., Joosten, M.H.A.J., Golstein, C., Westerink, N., Hille, J.H., Nijkamp, J.J., De Wit, P.J.G.M. & Jones, J.D.G. (1999) A second gene at the tomato Cf-4 locus confers resistance to *Cladosporium fulvum* through recognition of a novel avirulence determinant. *Plant Journal* 20:279-288.
- Thomas, C.M., Jones, D.A., Parniske, M., Harrison, K., Balint-Kurti, P.J., Hatzixanthis, K. & Jones, J.D.G. (1997) Characterization of the tomato *Cf-4* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies sequences that determine recognitional specificity in Cf-4 and Cf-9. *Plant Cell* 9:2209-2224.
- Van den Burg, H.A., Harrison, S.J., Joosten, M.H.A.J., Vervoort, J. & De Wit, P.J.G.M. (2006) *Cladosporium fulvum Avr4* protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:1420-1430.
- Van den Hooven, H.W., van den Burg, H.A., Vossen, P., Vervoort J. & de Wit, P.J.G.M. (2001) Disulfide bond structure of the Avr9 elicitor of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*: evidence for a cystine knot. *Biochemistry* 40:3458-3468.
- Van Dijkman, (1972) Natural resistance of tomato plants to *Cladosporium fulvum*, a biochemical study. PhD thesis University Utrecht.
- Van Dijkman, A. & Kaars Sijpesteijn, A., (1973) Leakage of preabsorbed P32 from tomato leaf discs infiltrated with high molecular weight products of incompatible races of *Cladosporium fulvum*. *Physiological Plant Pathology* 3: 57-67.
- Van Esse, H.P., Van 't Klooster, J.W., Bolton, M.D., Yadeta, K.A., Van Baarlen, P., Boeren, S., Vervoort, J., De Wit, P.J.G.M. & Thomma, B.P.H.J. (2008) The *Cladosporium fulvum* virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense. *Plant Cell* 20:1948-1963.
- Van Kan, J.A.L., Van den Ackerveken, G.E.J.M. & De Wit, P.J.G.M. (1991) Cloning and characterization of cDNA of avirulence gene *Avr9* of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4:52-59.
- Vleeshouwers, V.G.A.A. & Oliver, R.P. (2014) Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic and necrotrophic plant pathogens. *Molecular plant-Microbe Interactions* 27: 196-206.
- Westerink, N., Brandwagt, B.F., De Wit, P.J.G.M. & Joosten, M.H.A.J. (2004) *Cladosporium fulvum* circumvents the second functional resistance gene homologue at the Cf-4 locus (Hcr9-4E) by secretion of a stable avr4E isoform. *Molecular Microbiology* 54:533-545.