

Rolf Folkertsma¹,
Aska Goverse², Karin
Posthuma³, Eelco
Gilijamse⁴, Thijs
Simons⁵ & Ton Allersma¹

'Intraspecific pathogen variation' Verslag KNPV/Plantum/EPS-eendagsconferentie Wageningen, 22 januari 2013

¹ Monsanto Holland BV
² Wageningen University,
Laboratorium voor
Nematologie
³ Enza Zaden
⁴ Rijk Zwaan Nederland BV
⁵ Plantum

Dinsdag 22 januari jl. werd in Wageningen een eendagsconferentie gehouden getiteld 'Intraspecific pathogen variation - implications and opportunities'. Deze conferentie werd georganiseerd naar aanleiding van discussies over het werken met intraspecifieke variatie voor diagnostiek en veredeling binnen de Nematodenwerkgroep van de KNPV en de Isolaten-beheerwerkgroep van Plantum. Het doel van de bijeenkomst was a.) onderzoekers uit de private en de publieke sector samenbrengen om recente ontwikkelingen te bespreken in fundamentele en toegepaste aspecten van het werken met intraspecifieke variatie, en b.) het stimuleren van uitwisselen van ideeën binnen en tussen beide groepen, voor mogelijke vervolginiciatieven.

Intraspecifieke diversiteit

Binnen een week na aankondiging werd het beoogd aantal deelnemers aan de dag (100) bereikt en uiteindelijk waren er 105 aanwezig op deze bijeenkomst, waarvan 60% met een publieke en 40% met een private werkgever. Blijkbaar voorzag deze dag in een behoefte. De implicatie van de intraspecifieke diversiteit van plantpathogenen binnen het onderzoek naar plant-pathogeen-interacties, diagnostiek en veredeling stond centraal. Het interdisciplinaire karakter van de bijeenkomst kwam tot uiting in de keuze van de sprekers, die afkomstig waren uit verschillende themagebieden en organisaties. Het onderwerp werd behandeld voor verschillende pathogengroepen, variërend van virussen, oömyceten, schimmels en bacteriën tot nematoden. Een aantal zaken kwam dan ook tijdens de presentatie en aansluitende discussie van de verschillende presentaties terug:

- het belang van eenzelfde taal om intraspecifieke variatie te beschrijven (lieft over

- verschillende pathogeen-groepen heen),
- het belang van de beschikbaarheid van een goed gekarakteriseerde isolatencollectie (zowel moleculair als fenotypisch) voor onderzoek in zowel de publieke als private sector,
- de mogelijkheden die *high-throughput* sequencing-methodieken bieden voor het karakteriseren van intraspecifieke variatie,
- de noodzaak van goede kennis van het pathogeen om de biologische relevantie van de overweldigende hoeveelheid sequentie-informatie uit het genoom te kunnen duiden,
- de noodzaak van goede kennis van de evolutie van genomen om sequenties te identificeren voor verwantschapsanalyses tussen soorten of binnen soorten, en daaruit voortvloeiend
- de keuze van de juiste merkers voor (moleculaire) diagnostiek.

Next generation sequencing

Duidelijk werd dat we in een spannend tijdperk leven, waarin met behulp van *Next Generation Sequencing*-technologie de intraspecifieke variatie van pathogenen in een snel tempo wordt blootgelegd. Leidt een toename van het gebruik van moleculaire technieken, en met name sequentie-analyses, tot een alles omvattende fytopathologische discipline die duurzame oplossingen zal leveren voor de controle van problematische pathogenen via resistentie over de gewassen heen? Immers DNA = DNA, of dat nu komt van een nematode, een oömyceet of een virus. Uit de besprekingen van de dag kwam helder naar voren dat de toename in sequentiegegevens, en het steeds geavanceerder worden van (bio-)informatica-gereedschappen om die gegevens te duiden, voorbij dreigt te gaan aan het specifieke karakter van de plant-pathogeen in-

teractie voor verschillende pathogenen. Bijvoorbeeld alle plantenpathogenen scheiden elicatoren uit, maar wat die elicatoren doen, onder wat voor selectieve druk ze staan en hoe de interactie in de plant plaatsvindt met plant-eigen eiwitten is erg plant-pathogeen specifiek. Een grondige kennis van de biologie van die interactie is daarom uitermate belangrijk om de juiste hypothesen te kunnen opstellen. Daarbij vormen moleculaire technieken en (bio-)informatische verwerking van gegevens een steeds belangrijker gereedschap, die ons in staat zal stellen duurzame oplossingen voor prangende vragen rond pathogeen virulentie en plant-resistentie te vinden. Uiteindelijk zal dat helpen bij het verder verbeteren van gewasopbrengst waarvan miljarden mensen afhankelijk zijn.

Beschrijving van de gegeven presentaties

Rolf Folkertsma (Monsanto Holland B.V.) opende de dag en lichtte het doel van de bijeenkomst kort toe. Hij schetste verder wat achtergrondinformatie en introduceerde het programma.

Daarna gaf **Eelco Gilijamse** (Rijk Zwaan Nederland B.V.) een overzicht van de activiteiten van de Plantum-werkgroep Fytopathologie. Het doel van deze werkgroep is a.) het benoemen van isolaten die resistenties doorbreken, b.) het ontwikkelen van differentiële sets van rassen voor een

goede virulentie-karakterisering van pathogeen-isolaten, c.) het publiceren van bevindingen in publieke publicaties, en d.) het ondersteunen van commerciële resistentie-claims. Daarnaast houdt de werkgroep een collectie pathogeen-isolaten in stand (bacterie, oömyceet, schimmel en virus) en stelt die beschikbaar voor gebruik binnen de veredelingssector en (publiek) onderzoek. De collectie bestaat uit isolaten waartegen veredelingsbedrijven resistentie hebben geïdentificeerd waarvoor in commerciële hybriden claims zijn vastgelegd.

Harrie Koenraadt (Naktuinbouw) ging vervolgens in op de (moleculaire) verwantschapsstudies die de afgelopen jaren zijn uitgevoerd om *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) te karakteriseren. Naktuinbouw bezit een grote collectie (>800 isolaten) van Cmm en nauwverwante soorten ('look-alikes') die geïsoleerd werden vanuit tomatenplanten en zaad. Met behulp van AFLP (en zeer recentelijk *high-throughput* sequencing) is de moleculaire verwantschap tussen Cmm-isolaten en een aantal verwante *Clavibacter* spp.-isolaten vanuit de hele wereld onderzocht. Enerzijds om een aantal urgente vragen rond recente besmettingen op te helderen, anderzijds om een veel beter inzicht te krijgen in de genetische diversiteit van Cmm en look-alike-isolaten. Het uiteindelijke doel is om zeer specifieke en gevoelige complementaire moleculaire detectiemethoden te ontwikkelen en



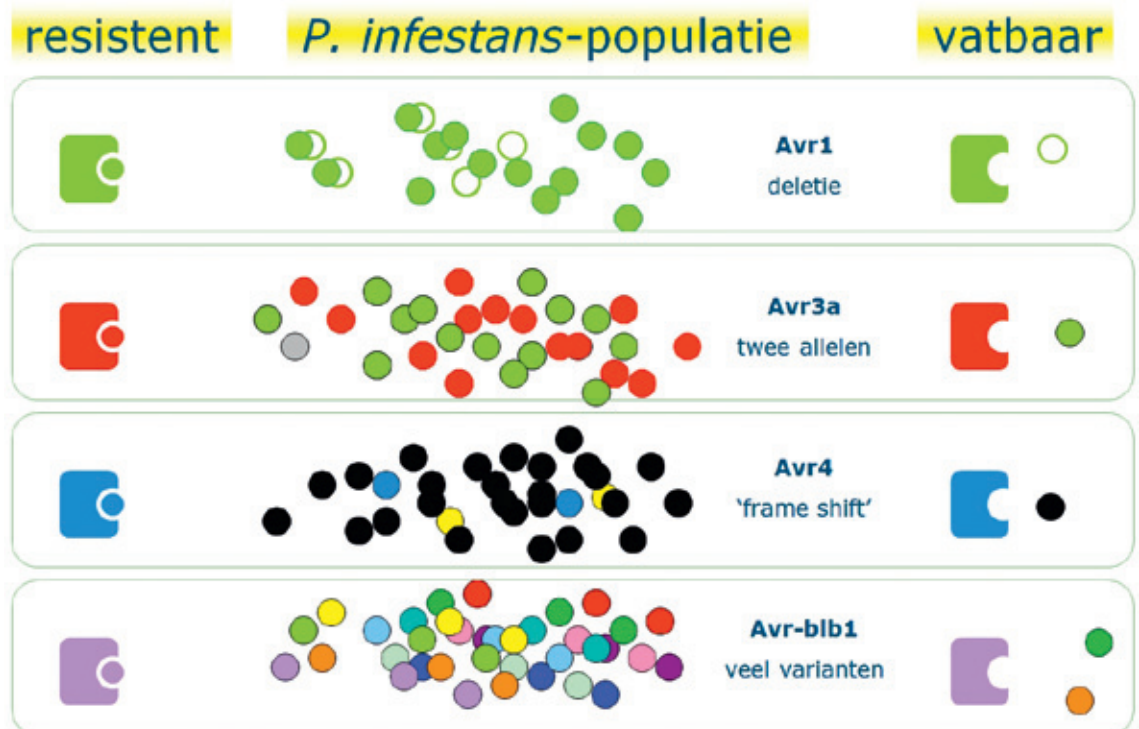
Symptomen van Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis op tomaat. Bron: Mary Ann Hansen, Forestry images.

te valideren waardoor de kans op zaadbesmettingen in de nabije toekomst verder zal afnemen. Inzicht in de genetische diversiteit van Cmm is niet alleen belangrijk vanuit het perspectief van detectie maar zou ook belangrijk kunnen zijn voor resistentieveredeling.

Bart Thomma's (Wageningen UR) presentatie ging in op de moleculaire verschillen tussen race 1 (avirulent op tomaten met het *Ve1*-resistentiegen) en race 2 (virulent op tomaten met het *Ve1*-resistentiegen). Door het genoom van verschillende race 1 en race 2-isolaten volledig te sequensen en onderling te vergelijken bleek een stuk DNA aanwezig in race 1-isolaten dat volledig ontbrak in race 2-isolaten. Nadere analyse van de genen op dit stuk resulteerde in de identificatie van *AvrVe1*, het avirulentie-eiwit dat geproduceerd wordt door race 1-isolaten en door het *Ve1*-gen herkend wordt. Wat echter ook duidelijk werd is dat isolaten zonder *AvrVe1* minder agressief zijn op vatbare tomaat dan isolaten met *AvrVe1*. Toen vervolgens naar de genoomorganisatie van een race 1 en een race 2-isolaat werd gekeken bleek dat stukken chromosoom van het race 1-isolaat op heel andere chromosomen terecht waren gekomen in het race 2-isolaat. Daarnaast bleek dat kleine stukken chromosoom specifiek

voorkomen in het race 1 of in het race 2-isolaat. Functionele analyse van genen op die race-specifieke stukken genoom resulteerde meestal in een functie gekoppeld aan agressiviteit.

Na de lunch gaf **Francine Govers** (Wageningen UR) een overzicht van recent onderzoek aan het geslacht *Phytophthora*. Anno 2013 zijn er meer dan 110 *Phytophthora*-soorten beschreven en dit aantal neemt nog steeds toe. Zo worden in metagenomica-analyses van grondmonsters voortdurend nieuwe *Phytophthora*-soorten gevonden waarvan vaak niet bekend is welke waardplanten ze hebben. Het vergelijken van gehele genoomsequenties van enkele soorten heeft geleid tot identificatie van grote families van genen die coderen voor zogenaamde RxRL-effectoren welke een rol spelen bij gastheerspecificiteit. Inzoomend op *Phytophthora infestans*, de veroorzaker van de aardappelziekte, is gebleken dat in de jaren '80 de genetische diversiteit in Europa (en de rest van de wereld) enorm is toegenomen. Dit wordt toegeschreven aan de komst van een geheel nieuwe populatie bestaande uit A1 en A2 *mating type*-isolaten waardoor de oömyceet in Europa van klonaal (alleen het A1-*mating type* kwam hier voor) seksueel werd. Dit heeft geleid tot een hogere ziektedruk en een

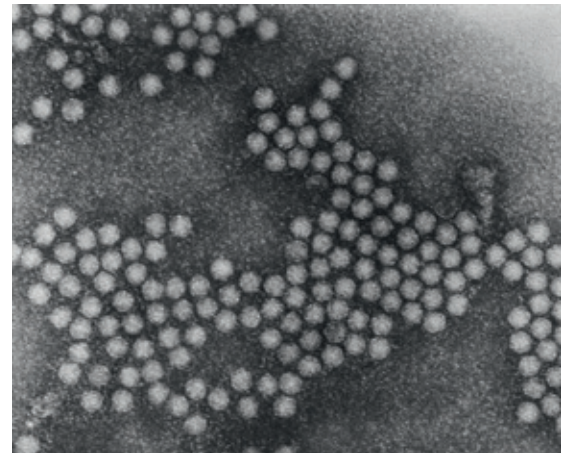


Reactie van *Phytophthora* op herkenning door de plant. Stoffen die *Phytophthora* uitscheidt (effectoren, voorgesteld als bolletjes) worden herkend door resistentie-eiwitten in de plant (vierkantjes). Herkenning leidt tot een resistentiereactie. In de *Phytophthora*-populatie verschijnen isolaten die herkenning omzeilen doordat ze een bepaalde effector niet langer maken (deletie of 'frameshift'), of een net iets andere effector maken (twee allelen of veel varianten).

dringende behoefde aan cultivars die minder vatbaar zijn voor de aardappelziekte. Veredelaars richten zich momenteel voornamelijk op het inkruisen van NBS-LRR-resistentiegenen coderend voor eiwitten die specifieke RxRL-effectoren herkennen. Inmiddels zijn tenminste 15 van die resistentiegenen in aardappel gekloneerd. Daar tegenover staat in *P. infestans* een grote hoeveelheid RxLR-effectoren die uitermate snel evolueren waardoor resistenties snel doorbroken worden. Dit beeld wordt nog eens bevestigd middels een monitoring van aanwezige effectoren in *P. infestans*-isolaten in aardappelteeltgebieden. Een goed overzicht van verschuivingen in effector-frequenties in tijd en ruimte is van groot belang voor een geïntegreerde bestrijding van *P. infestans* middels het gericht inzetten van resistentiegenen. Daarnaast is dat inzicht belangrijk voor het identificeren van resistenties met een breed werkingsspectrum.

Hans Helder (Wageningen UR) beschreef de enorme diversiteit van het Fylum Nematoda en de paradox dat een morfologisch uniform organisme zo'n grote soortendiversiteit kent. Met behulp van het SSU ribosomaal DNA heeft de leerstoelgroep Nematologie inmiddels meer dan 2700 soorten in een fylogenie kunnen plaatsen. Daaruit komt bijvoorbeeld naar voren dat plantenparasitisme op verschillende momenten in de evolutie van nematoden is ontstaan. Het voordeel van het werken met het SSU-ribosomaal DNA om verwantschap tussen nematodensoorten te bepalen is de variatie in sequentie-evolutie per codon, variërend van zeer conservatief tot zeer variabel. De conservatieve delen stellen je in staat het fragment in tot nog toe al de nematodensoorten met PCR te vermenigvuldigen, wat ook kansen biedt voor diagnostiek in een monster (grond, plant, water, ...). Voor het aardappelsystenaaltje lijken elicitoren, zoals bijvoorbeeld *SPRYSEC19*, een belangrijke rol te spelen in een specifieke interactie met de aardappel. Een verdere karakterisering van de functie van elicitoren in hun interactie met aardappelresistentie zou tot een aanzienlijke verbetering in het pathotype-concept bij het aardappelsystenaaltje kunnen leiden.

René van de Vlugt (Wageningen UR) gaf vervolgens een overzicht van de evolutie van plantenvirussen. In vergelijking met andere groepen van organismen zijn virussen op het oog verbazingwekkend weinig divers. Slechts rond de 2700 soorten zijn wereldwijd officieel



Elektronenmicroscopische foto van gezuiverde deeltjes van het aardappelbladrolvirus. Copyright Plant Research International.

beschreven (terwijl de leerstoelgroep Nematologie alleen al rond de 2700 nematoden soorten in een fylogenie beschreven en in haar collectie heeft). Overigens is de verwachting dat met behulp van moleculaire technieken in de nabije toekomst nog vele nieuwe virussoorten beschreven gaan worden. Plantenvirus-evolutie wordt hoofdzakelijk bepaald door a.) grote bottlenecks waar het virus doorheen gaat bij iedere infectie, b.) een relatief klein genoom (wat het aantal variaties beperkt) en c.) een zeer 'promiscue' levenswijze (en dat voor een dood organisme...) waarbij tijdens gemengde infecties hele stukken genoom tussen virusdeeltjes uitgewisseld worden. Dit laatste gebeurt met name omdat de meeste resistenties in planten geen immuniteit geven waardoor vaak sprake is van gemengde infecties. Virus-titers van in potentie verschillende genotypen in de plant blijven gehandhaafd waardoor binnen soorten, maar soms ook tussen soorten, vrijelijk genetisch materiaal uitgewisseld wordt. Die uitwisseling kan tot een mogelijk nieuwe virulentie leiden. We weten echter nog erg weinig over de ecologische rol van virussen en hun verspreiding.

De dag werd afgesloten door **Rolf Folkertsma**. Hij stond stil bij de hoofdbevindingen van de dag en bedankte de sprekers.

Dankwoord

Met dank aan Harrie Koenraadt, Bart Thomma, Francine Govers, Hans Helder, René van der Vlugt en Liesbeth Bouwman.