

Taxonomie van plant-pathogene schimmels als basis voor identificatie en detectie

Resultaten van het Uitvoeringsconsortium Schimmels

Lute-Harm Zwiers¹,
Maikel Aveskamp¹,
Peter Bonants²,
Henk Brouwer¹,
Arthur de Cock¹,
Ulrike Damm¹,
Hans de Gruyter³,
Ellis Meekes⁴,
Els Verstappen²
en Joyce Woudenberg¹

Inleiding

Plant-pathogene schimmels worden traditioneel geïdentificeerd op basis van morfologische karakteristieken. Dit is over het algemeen tijdrovend en vraagt veel expertise. Verder leidt dit vaak tot misidentificatie als gevolg van het naast elkaar bestaan van verwante pathogene en niet-pathogene soorten die niet of nauwelijks van elkaar zijn te onderscheiden.

Het doel van het werk uitgevoerd door het uitvoeringsconsortium schimmels was dan ook gericht op de verbetering van detectie- en

identificatietechnieken van plant pathogene schimmels met de nadruk op quarantaine-organismen. Hiertoe is van een aantal geselecteerde genera een *up-to-date* collectie samengesteld van de aanwezige soorten en isolaten. Van deze soorten / isolaten zijn taxonomische, morfologische, en moleculaire data gegenereerd die zijn opgenomen in genus specifieke databases. Deze databases zijn een onderdeel van Q-bank (www.q-bank.eu/fungi). Hiermee kan de taxonomische basis worden gelegd voor een optimaal onderscheid van soorten, noodzakelijk voor de ontwikkeling van soortspecifieke detectie-

¹ CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht

² Plant-Research International, Wageningen

³ nVWA Divisie Plant, Nationaal Referentiecentrum Wageningen

⁴ Naktuinbouw, Roelofarendsveen

en identificatietechnieken. Op grond van het economische, wetenschappelijke, en ecologische belang, de aanwezigheid van Q-organismen, en de wetenschappelijke startpositie binnen Nederland is in eerste instantie de keuze gevallen op de geslachten *Colletotrichum*, *Phoma*, en *Phytophthora*.

Colletotrichum is vooral bekend als de veroorzaker van anthracnose (dode plekken) op diverse waardplanten en is van groot belang in de aardbeienteelt. Verschillende grote soortcomplexen spelen bij *Colletotrichum* een rol. Deze complexen bestaan uit diverse nauwverwante soorten die over het algemeen morfologisch niet of nauwelijks te onderscheiden zijn. In dit project is er dan ook voor gekozen de morfologische identificatie te koppelen aan moleculaire analyse om zo de taxonomische status van de talloze *Colletotrichum*-soorten te ontrafelen. Nederland heeft in het verleden een belangrijke rol gespeeld in de *Colletotrichum*-taxonomie en vele isolaten waren dan ook beschikbaar voor onderzoek.

Het geslacht *Phoma* bevat verschillende Q-(waardige) organismen, waaronder de belangrijke Q-aardappelpathogenen *P. andigena* en *P. crystalliniformis*, en organismen die de kwaliteit van het product aantasten, zoals *P. foveata*. In Nederland vindt al meer dan veertig jaar onderzoek plaats aan *Phoma*. Hierdoor ligt het zwaartepunt van de wereldwijde kennis op het gebied van *Phoma* in Nederland en is een uitgebreide werkcollectie beschikbaar. Aan het begin van dit project was de taxonomische indeling van dit genus voornamelijk gebaseerd op morfologische karakteristieken en dit leidde tot een artificiële indeling in secties. Deze indeling stond ter discussie en in dit project werden naast morfologische beschrijvingen dan ook moleculaire technieken toegepast om te komen tot een nieuw en geaccepteerd genus- en soortconcept.

Phytophthora is een geslacht van voornamelijk

plantpathogene oömyceten. Dit genus is van groot belang in de akkerbouw, (glas)tuinbouw, sierteelt en de boomkwekerij. *Phytophthora* bevat diverse Q-organismen zoals *P. ramorum*, *P. lateralis* en *P. fragariae*. Als gevolg van de ontwikkeling van nieuwe moleculaire technieken en de toename van gerichte surveys worden met regelmaat nieuwe soorten gevonden, evenals hybriden. In het kader van dit project is de collectie dan ook geactualiseerd met nieuwe beschreven soorten, en is de karakterisering verbeterd door gebruik te maken van geactualiseerde en gestandaardiseerde morfologische en moleculaire data.

Colletotrichum-soortcomplexen

Colletotrichum is de veroorzaker van anthracnose op diverse belangrijke gewassen. Ongeveer 700 soorten zijn beschreven, maar de taxonomische status is veelal onduidelijk. Op aardbei kan dit pathogeen voorkomen op diverse plantendelen zoals kroon, blad en uitloper maar is hier vooral van belang als veroorzaker van vruchtrot.

De soorten die verantwoordelijk zijn voor de ziekte op aardbei, *C. acutatum*, *C. dematium*, *C. fragariae*, en *C. gloeosporioides* maken deel uit van grote soortcomplexen. De vraag is hoeveel en welke soorten verantwoordelijk zijn voor de ziekte op aardbei en hoe deze kunnen worden onderscheiden van andere *Colletotrichum*-soorten. In het FES-programma 'Versterking Infrastructuur Plantgezondheid' is gekozen voor een moleculaire identificatie van deze soortcomplexen door middel van multi-locus fylogenie¹ en een morfologische karakterisatie van ex-typestammen^{2,3}. Van alle beschikbare *Colletotrichum*-isolaten (ca 1000) zijn ITS-sequenties⁴ gegenereerd en om de soorten binnen de complexen nader te kunnen definiëren is de sequentie van zes additionele genen bepaald (coderend voor actine, -tubuline, chitinesynthase, histon3, calmoduline, en glyceraldehyde 3 fosfaat dehydrogenase).

¹ Multi-locus fylogenie:

Fylogenie is de studie van de evolutie en ontstaansgeschiedenis van organismen. Dit kan onder meer door te kijken naar de overeenkomsten en verschillen in DNA-sequenties. Indien dit wordt gedaan voor meerdere genetische loci spreekt men van multi-locus fylogenie. Het resultaat wordt meestal grafisch weergegeven als een stamboom.

² Typestam:

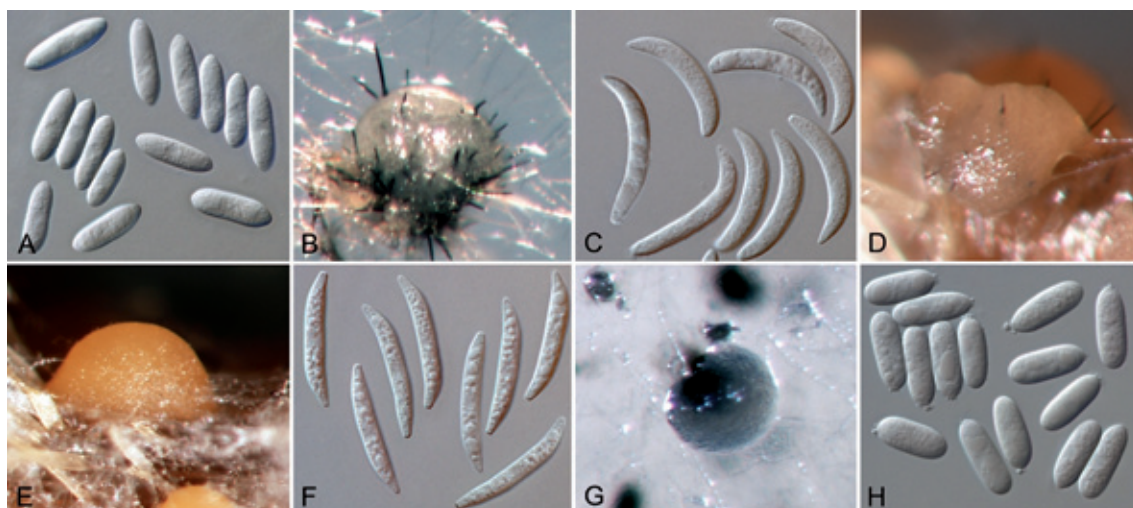
De stam of isolaat van een soort waaraan formeel de wetenschappelijke naam verbonden is.

³ Ex-typestam:

Levend isolaat of stam verkregen van typestam indien deze permanent bewaard wordt in metabool inactieve vorm.



Figuur 1. A: Ziektebeeld veroorzaakt door *Colletotrichum* op aardbei, B: Ziektebeeld veroorzaakt door *Phoma terrestris* op ui. C: Ziektebeeld veroorzaakt door *Phytophthora nicotianae* op Skimnia



Figuur 2. Voorbeelden van morfologische data zoals opgenomen in de *Colletotrichum*-database. Ongeslachtelijke sporen en vruchtlichamen van vier *Colletotrichum*-soorten. A, E: *C. acutatum*. B, F: *C. lineola*. C, G: *C. truncatum*. D, H: *C. gloeosporioides*.

Colletotrichum-soorten met gebogen conidia (ongeslachtelijke sporen) worden meestal geïdentificeerd als *C. dematium*. Ons onderzoek heeft uitgewezen dat *C. dematium* bestaat uit verschillende, niet nauwverwante soorten (Damm *et al.*, 2009). Vier nieuwe soorten zijn beschreven en zeven bestaande soorten gedefinieerd. Op grond hiervan konden isolaten voorkomend op aardbei worden geïdentificeerd als *C. lineola* en *C. truncatum*.

C. acutatum is wereldwijd de belangrijkste veroorzaker van aardbei-anthraxnose. De eerder beschreven indeling van het *C. acutatum*-soortcomplex in acht groepen (Sreenivasaprasad & Talhinhas, 2005) werd door ons onderzoek bevestigd en deze groepen werden gedefinieerd als verschillende soorten. Vijf soorten binnen het *C. acutatum*-complex bleken isolaten te bevatten afkomstig van aardbei. Dit is des te relevanter gezien het feit dat *C. acutatum* tot september 2008 op de Q-lijst stond, maar daarvan af is gehaald zonder dat in feite duidelijk was welke *Colletotrichum* verantwoordelijk is (zijn) voor de ziekte.

Het *C. gloeosporioides*-complex is zeer divers en bevat een groot aantal soorten. Het bleek dat isolaten afkomstig van aardbei minder divers zijn. Op grond van ITS-data werden isolaten afkomstig van aardbei aangetroffen in slechts twee groepen, waarvan één groep gevormd wordt door *C. fragariae*. *C. boninense* is één van de soorten die oorspronkelijk werden geïdentificeerd als *C. gloeosporioides*. Aanwijzingen dat *C. boninense* zelf ook een soortcomplex was werden bevestigd (Johnston *et al.*, 2005). Verschillende soorten

konden worden herkend op basis van morfologie, waardplantspecificiteit en verspreiding.

Het in het kader van dit project verrichte onderzoek heeft aldus een belangrijke bijdrage geleverd aan de ontrafeling van de *Colletotrichum*-soortcomplexen. De gegenereerde data zijn opgenomen in de Q-bank *Colletotrichum* database.

Phoma

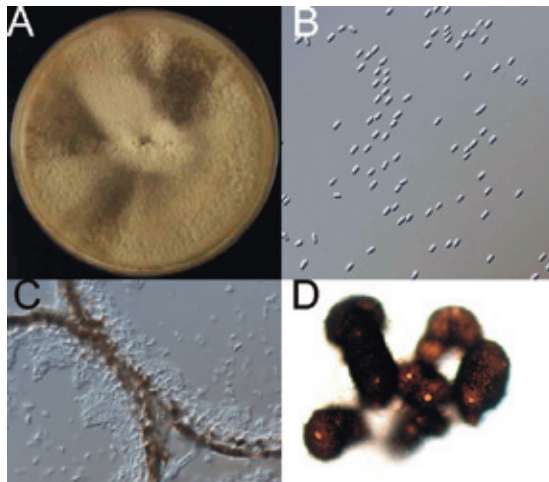
Het asexuele genus *Phoma* vormt doorzichtige sporen in pycniden (ongeslachtelijke vruchtlichamen). In de literatuur zijn ruim 3000 soorten beschreven. De meeste soorten zijn beschreven op plantmateriaal, waarbij later bij het uitkweken op voedingsbodems bleek dat het veelal gaat om synoniemen. Op de Plantenziektenkundige Dienst (PD), recent opgegaan in de nieuwe Voedsel en Warenautoriteit (nVWA), divisie Plant, is jarenlang taxonomisch onderzoek aan *Phoma* verricht. Dit onderzoek werd uitgevoerd in samenwerking met het Centraalbureau voor schimmelcultures (CBS-KNAW). Het genus omvat belangrijke plantenpathogenen, sommigen met een quarantainestatus, zoals de aardappelpathogenen *Phoma andigena* en *P. crystalliniformis*, maar ook *P. tracheiphila*, verantwoordelijk voor een vaatziekte bij citrus bekend onder de naam 'mal secco'. Het onderzoek op de nVWA was gericht op de morfologische karakterisering van de plantpathogene *Phoma*-soorten in cultures, waarbij de algemeen voorkomende, saprobe (van dood organisch materiaal levende) soorten ook werden meegenomen. Deze saprobe soorten worden vaak

⁴ ITS:

Internal Transcribed Spacer: sequenties coderend voor niet-functioneel RNA gelegen tussen structurele ribosomale RNAs (rRNA). ITS-sequenties zijn loci die vaak gebruikt worden voor het construeren van moleculair fylogenetische stambomen.

⁵ nrDNA:

Nucleair ribosomaal DNA: DNA coderend voor ribosomaal RNA (rRNA). rRNA is RNA waaruit ribosomen zijn opgebouwd, de organellen waarin de eiwitsynthese plaatsvindt. De zogenaamde 5S, 5.8S en 28S rRNA's vormen samen de LSU (large subunit) terwijl de 18S rRNA de SSU (small subunit) vormt.



Figuur 3. Voorbeelden van morfologische data zoals opgenomen in de *Phoma* database.

Morfologische kenmerken van Phoma pedaeiae, een recent beschreven soort vernoemd naar de voormalige Plantenziektenkundige Dienst: A: culture op haveremoutagar. B: conidiën. C: conidiogene cellen in pycnide. D: pycnidien.

van plantmateriaal of uit de grond geïsoleerd en hun aanwezigheid kan leiden tot misidentificaties. Dit geldt ook voor de pycnide-vormende schimmels behorende tot morfologisch sterk op *Phoma* lijkende en verwante genera zoals *Ascochyta* en *Phyllosticta*, welke vaak in de literatuur zijn verward met *Phoma*. Het onderzoek op de PD werd in 2004 afgerond met de uitgave van de “*Phoma* Identification Manual”, waarin de morfologische beschrijvingen van 223 *Phoma*-soorten zijn opgenomen (Boerema *et al.*, 2004). Ondanks de aanwezigheid van deze “Identification Manual” blijft het identificeren van *Phoma* op basis van morfologische kenmerken van isolaten tijdrovend, en vraagt het veel expertise. Bijkomend probleem is dat de diagnostische kenmerken vaak overlappend zijn, zelfs met soorten van verwante genera.

In het kader van het FES-programma is dan ook gewerkt aan typering van het geslacht *Phoma* op basis van moleculaire karakteristieken. Het

moleculair fylogenetisch onderzoek heeft een geheel nieuwe taxonomische indeling opgeleverd van *Phoma*. In het genus *Phoma* zijn slechts 75 soorten gehandhaafd, en 150 soorten zijn beschreven in nieuwe genera (Aveskamp *et al.*, 2009, De Gruyter *et al.*, 2009, De Gruyter *et al.*, 2010, Woudenberg *et al.*, 2009). Ook zijn de aardappelpathogenen *P. andigena* en *P. crystalliniformis* recent herbeschreven in het genus *Stagonosporopsis* (Aveskamp *et al.*, 2010).

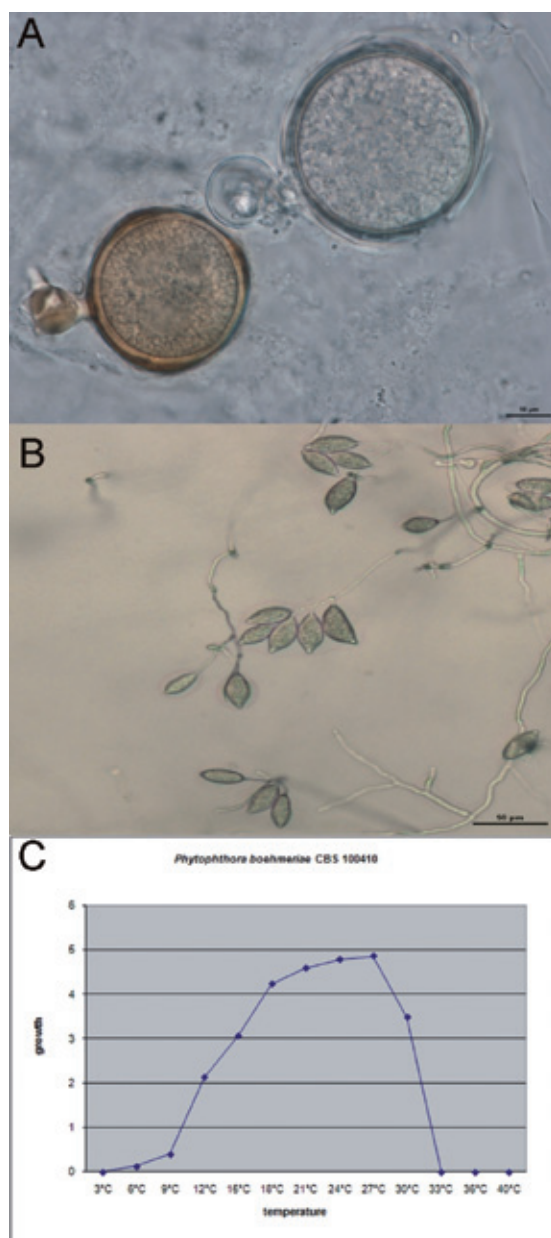
Er zijn ca 2000 DNA-sequenties van *Phoma* en gerelateerde soorten gegenereerd en vastgelegd in Q-bank. Deze sequenties zijn van DNA-regio's waarin binnen soorten doorgaans weinig variatie is (de zogenaamde 18S nrDNA (SSU) ⁵, 28S nrDNA (LSU), Internal Transcribed Spacer regions 1 & 2 en 5.8S nrDNA (ITS)), alsmede van de ‘huishoudgenen’ actine, β -tubuline en calmoduline. De isolaten waarvan deze sequenties werden bepaald zijn goed gedocumenteerd en opgenomen in de collectie van het CBS. Met deze gegevens kunnen nieuwe onbekende isolaten snel en betrouwbaar worden geïdentificeerd. De nieuwe inzichten die zijn verkregen over de moleculair fylogenetische verwantschap tussen soorten vormen de betrouwbare basis voor de ontwikkeling van soortspecifieke detectietechnieken. De behaalde onderzoeksresultaten zijn vastgelegd in diverse publicaties. Daarnaast heeft het onderzoek co-auteurschap opgeleverd in een aantal publicaties, en daarmee bijgedragen aan de bekendheid van het FES-programma ‘Versterking Infrastructuur Plantgezondheid’.

Phytophthora

Het genus *Phytophthora* is bij velen voornamelijk bekend vanwege *P. infestans*, de veroorzaker van de aardappelziekte en Q-organismen zoals *P. ramorum*, *P. lateralis* en *P. fragariae*. Het genus bestaat echter uit ruim honderd soorten, waarvan het merendeel plantpathogeen is. Iets minder



Figuur 4. Moleculaire multi-locus fylogenie van de aardappelpathogenen *Stagonosporopsis andigena* en *S. crystalliniformis*, gebaseerd op sequenties van LSU, ITS en β -tubuline. Beide soorten waren op basis van morfologie oorspronkelijk beschreven in het genus *Phoma*.



Figuur 5. Voorbeelden van morfologische en fysiologische karakteristieken zoals opgenomen in de Q-bank *Phytophthora*-database. A: Oogonia van *Phytophthora austrocedrae*. B: Sporangia van *Phytophthora morindae*. C: Temperatuur afhankelijke groeicurve van *Phytophthora boehmeriae*.

dan de helft hiervan is beschreven in de laatste tien jaar. Deze toename van nieuwe soorten kan verklaard worden door het beschikbaar komen van moleculaire identificatiemethoden, maar ook doordat het aantal surveys sterk is toegenomen als reactie op de problemen met recent ontdekte soorten als *P. kernoviae*, *P. ramorum* en *P. alni*. Een voorbeeld hiervan is 'Sudden oak death' het massaal afsterven van bepaalde eikensoorten in Californië. Deze ziekte met een enorme impact op het landschap wordt veroorzaakt door *P. ramorum*.

Van veel belangrijke pathogene *Phytophthora* soorten is vastgesteld dat deze in Europa of elders geïntroduceerd zijn als gevolg van de handel in plantmateriaal. Het voorkomen van verdere verspreiding van deze en nieuwe pathogenen is van groot economisch belang. Het succes hiervan is afhankelijk van tijdige detectie en betrouwbare identificatie van *Phytophthora*-soorten. De Q-bank *Phytophthora*-database is opgezet om dit mogelijk te maken. Identificatie van bijv. *P. fragariae*, de veroorzaker van roodwortelrot in aardbei, gebeurde in het verleden aan de hand van de vorm van de oösporen. Indien, ondanks de aanwezigheid van duidelijke symptomen, oösporen niet konden worden gedetecteerd dan was identificatie niet mogelijk en het nemen van daaraan gekoppelde maatregelen evenmin. Het beschikbaar hebben van meerdere methoden voor identificatie is daarom onontbeerlijk ter voorkoming van verdere verspreiding van pathogenen.

Omdat veel literatuur over *Phytophthora* door het opsplitsen van soorten en de vele nieuwe beschrijvingen verouderd is geraakt, is er voor gekozen om de Q-bank *Phytophthora*-database te baseren op een vergelijkende studie waarin alle soorten opnieuw bekeken zijn. De database is hierdoor tevens een waardevolle informatiebron en naslagwerk voor het genus *Phytophthora*. De informatie is gekoppeld aan specifieke isolaten, waar mogelijk meerdere per soort, waardoor bij nieuwe soortbeschrijvingen informatie gemakkelijk aangepast kan worden. Tijdens de studie is ook gekeken naar de verwantschap van *Phytophthora* met gerelateerde genera zoals *Pythium*. Hierbij is gebleken dat een aantal soorten die oorspronkelijk tot *Pythium* gerekend werden eigenlijk nauwer verwant zijn aan *Phytophthora*. Deze soorten zijn beschreven in het nieuwe genus *Phytopythium* (Bala et al., 2010).

De Q-bank *Phytophthora*-database bevat morfologische, moleculaire (sequenties van -tubuline, ITS, cytochroom oxidase 1 en elongatie factor1), en fysiologische data (groeicurven). Daarnaast bevat de database additionele gegevens over ziektebeelden, herkomst, en waardplant van de gebruikte isolaten. Hoewel moleculaire gegevens de grootste betrouwbaarheid geven voor identificatie en waarschijnlijk in de praktijk ook het meest gebruikt zullen worden, is identificatie met behulp van de database in principe mogelijk op grond van alle typen data. Hiertoe is een identificatie-sleutel ontwikkeld, waarbij op meerdere eigenschappen kan worden gezocht.

Literatuur

- Aveskamp MM, Verkley GJM, de Gruyter J, Murace MA, Perelló A, Woudenberg JHC, Groenewald JZ and Crous PW (2009) DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. *Mycologia* 101(3): 363-382
- Aveskamp MM, de Gruyter J, Woudenberg JHC, Verkley GJM and Crous PW (2010) Highlights of the *Didymellaceae*: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology* 65: 1-65
- Bala K, Robideau G, de Cock AWAM, Abad ZG, Lodhi AM, Shahzad S, Ghaffar S, Coffey MD and Lévesque A. (2010) “*Phytophthium* Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi and Lévesque, gen. nov.”. *Fungal Planet* 49 –18 June, *Persoonial Reflections* 137
- Boerema GH, de Gruyter J, Noordeloos ME and Hamers MEC (2004) *Phoma* Identification Manual. Differentiation of specific and infra-specific taxa in culture. CABI publishing, Wallingford, Oxfordshire UK, 470 pp
- Damm U, Woudenberg JHC, Cannon PF and Crous PW (2009) *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Diversity* 39: 45–87
- de Gruyter J, Aveskamp MM, Woudenberg JHC, Verkley GJM, Groenewald JZ and Crous PW (2009) Molecular phylogeny of *Phoma* and allied anamorph genera: towards a reclassification of the *Phoma* complex. *Mycological Research* 113(4): 508-519
- de Gruyter J, Woudenberg JHC, Aveskamp MM, Verkley GJM, Groenewald JZ and Crous PW (2010). Systematic reappraisal of species in *Phoma* section *Paraphoma*, *Pyrenochaeta* and *Pleurophoma*. *Mycologia* 102: 1066-1081
- Johnston PR, Pennycook SR and Manning MA (2005) Taxonomy of fruit-rotting fungal pathogens: what’s really out there? *New Zealand Plant Protection* 58: 42–46
- Sreenivasaprasad S and Talhinhos P (2005) Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. *Molecular Plant Pathology* 6: 361-378
- Woudenberg JHC, Aveskamp MM, de Gruyter J, Spiers AG and Crous PW (2009) Multiple *Didymella* teleomorphs are linked to the *Phoma* clematidina morphotype. *Persoonia* 22: 56-62