

## Waardplant-binnendringing door plantenparasitaire nematoden gaat gepaard met het verbreken van zowel covalente als non-covalente verbindingen

Ling Qin<sup>1\*</sup>, Urszula Kudla<sup>1</sup>, Erwin Roze<sup>1</sup>, Aska Goverse<sup>1</sup>, Herman Popeijus<sup>2</sup>, Jeroen Nieuwland<sup>3</sup>, Hein Overmars<sup>1</sup>, John Jones<sup>4</sup>, Arjen Schots<sup>2</sup>, Geert Smant<sup>1</sup>, Jaap Bakker<sup>1</sup>, Johannes Helder<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium voor Nematologie,

<sup>2</sup>Laboratorium voor Moleculaire Herkenning en Antilichaam Technologie, EPW, Wageningen Universiteit, Binnenhaven 5, 6709 PD Wageningen, Nederland.

<sup>3</sup>Department voor Experimentele Botanie, EPW, Katholieke Universiteit van Nijmegen, Toernooiveld 1, 6525 ED Nijmegen, Nederland.

<sup>4</sup>Plant-Pathogen Interactions Programme, Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Dundee, DD2 5DA, United Kingdom. e-mail: ling.qin@wur.nl, hans.helder@wur.nl

De  $\alpha$ - en  $\beta$ -expansines vertegenwoordigen een klasse van planteneiwitten met een kenmerkend pH-afhankelijk vermogen om *in vitro* celwanden lossier te maken. Expansines, waarvan tot nu toe werd aangenomen dat ze alleen in het plantenrijk voorkwamen, induceren binnen enkele seconden na blootstelling het lossier (= rekbaarder) worden van plantencelwanden. Naar alle waarschijnlijkheid maakt het verzwakken van non-covalente verbindingen tussen celwandpolymeren deze expansie mogelijk. Hoewel DNA sequenties die enige gelijkenis vertonen met expansines al eerder buiten het plantenrijk werden aangetroffen, is de functionaliteit van deze 'kandidaat expansines' nooit aangetoond. Functionele assays zijn in dit verband van groot belang aangezien het hier een sterk heterogene eiwitfamilie betreft. Wij hebben een functioneel expansine ontdekt (*Gr-exp-1*) dat tot expressie komt in de subventrale klieren van het infectieuze stadium van het aardappelpycnosporen *Globodera rostochiensis*. Dit expansine heeft de functionele en structurele karakteristieken van een  $\beta$ -expansine. Binnen dit eiwit zijn twee domeinen te herkennen; een bacterieel type cellulose-bindend domein is via een flexibele linker verbonden met domein 2, het eigenlijke expansine deel. Het expansine deel vertoont 38% identiteit met een stijl-specifieke  $\beta$ -expansine uit tabak. Recombinante expressie van *Gr-exp-1* in tabak resulteerde in een functioneel expansine dat een vlotte celwandversoepeling teweegbracht in tarwe coleoptielen (een "type II" cel wand) waarvan de endogene expansines geïnactiveerd waren. De aanwezigheid van expansines in de secreties van aardappelpycnosporen maakt duidelijk dat het binnendringen van de plantenwortel mede het gevolg is van de verbreking van zowel non-covalente als covalente verbindingen. Naar alle waarschijnlijkheid

vergroten expansines de toegankelijkheid van deze zeer compacte polymeer matrix voor celwandafbrekende enzymen – nematoden scheiden een scala aan cellulolytische en pectolytische enzymen uit – met als gevolg dat de laatstgenoemden hun werk efficiënter kunnen doen. Deze vinding verklaart voor een substantieel deel waarom aardappelpycnosporen relatief vlot de wortel van een aardappelplant kunnen binnendringen (ze hebben voor iedere wortelcellaag ongeveer twee minuten nodig). Inmiddels in gebleken dat het voorkomen van expansines bij plantenparasitaire aaltjes geen zeldzaamheid is (ook aanwezig in andere cysten- en wortelknobbelaaltjes), en het is zeer wel denkbaar dat ze ook zullen worden aangetroffen in (plantenparasitaire) schimmels en bacteriën.

Referentie: Ling Qin, Urszula Kudla, Erwin Roze, Aska Goverse, Herman Popeijus, Jeroen Nieuwland, Hein Overmars, John Jones, Arjen Schots, Geert Smant, Jaap Bakker, Johannes Helder. Nematode expansin acting on plants. *Nature* 427: 30 (2004)

## Fylogenie van het geslacht *Botrytis*

Martijn Staats, Peter van Baarlen en Jan van Kan

Laboratorium voor Fytopathologie, Wageningen Universiteit, Binnenhaven 5, 6709 PD Wageningen. e-mail: martijn.staats@wur.nl

Schimmels van het geslacht *Botrytis* (teleomorf *Botryotinia*) kunnen ernstige schade veroorzaken in een groot aantal gewassen, zoals tomaat, druif, bloembollen en snijbloemen. Binnen onze groep wordt de verwantschap van *Botrytis* soorten op moleculair niveau bestudeerd en wordt binnen een aantal soorten gezocht naar factoren die de waardplant specificiteit bepalen.

Er is in de praktijk behoefte om een betrouwbare identificatiemethode voor *Botrytis*-soorten te ontwikkelen. De identificatie op basis van morfologie en waardplant-specificiteit is niet (altijd) betrouwbaar. De meest bekende soort, *B. cinerea*, kan meer dan 200 waardplanten infecteren. Alle andere soorten worden verondersteld waardplant specifiek te zijn, d.w.z. dat ze primair pathogeen zijn op een of enkele plantensoorten en als opportunist voorkomen op verwante soorten. De symptomen en ziekteontwikkeling van specialisten zijn vergelijkbaar met die van *B. cinerea*. Teneinde te kunnen beslissen om al dan niet tot bestrijding over te gaan bij constatering van aantasting door *Botrytis* is het dus van belang de soorten te kunnen onderscheiden. Een bruikbare determinatie-sleutel ontbreekt echter.

Er is tot op heden nog weinig gepubliceerd over de fylogenetische relatie binnen het geslacht *Botrytis*. In deze studie is gebruik gemaakt van sequentiegegevens

van drie nucleaire eiwitcoderende loci. Door de genologieën van deze loci te vergelijken kunnen soorten worden geïdentificeerd. De resultaten van dit onderzoek zullen bijdragen aan een betrouwbare methode om *Botrytis* soorten eenduidig te identificeren.

### Cytogenetica van *Fusarium*-schimmels

Cees Waalwijk<sup>1</sup>, Rahim Mehrabi<sup>1</sup>, M. Taga<sup>2</sup>,  
Theo van der Lee<sup>1</sup> en Gert Kema<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Plant Research International B.V., Droevendaalsesteeg 1, P.O.Box 16, 6700 AA Wageningen, Nederland.

<sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Science Okayama University, Okayama, Japan. e-mail: cees.waalwijk@wur.nl

De chromosomen van schimmels zijn vele malen kleiner dan die van planten en dieren, waardoor klassieke cytologische methoden niet op schimmels kunnen worden toegepast. Om de chromosomen van verschillende *Fusarium* soorten zichtbaar te maken werd gebruik gemaakt van een methode waarbij kiembuizen worden opengebusten, de zogenoemde GTBM (Germ Tube Burst Method). Met deze methode is het mogelijk op precies het aantal chromosomen van schimmels vast te stellen. De condities voor het produceren van voldoende sporen van goede kwaliteit werden voor verschillende *Fusarium* soorten uitgezocht, alsook de incubatie omstandigheden voor het verkrijgen van kiembuizen van de goede lengte. In meerdere isolaten van *Fusarium graminearum* (perfecte stadium *Gibberella zeae*) werden met behulp van de GTBM vier chromosomen waargenomen. Dit aantal is in prima overeenstemming met de gecombineerde genetische en fysische kaart van het isolaat PH-1 (=NRRL 31084), waarvan in 2003 de sequentie beschikbaar is gekomen. Dit isolaat behoort tot de zogenaamde lineage 7, die de belangrijkste populatie van *F. graminearum* vormt op tarwe en gerst in zowel West-Europa als Noord-Amerika. In tegenstelling tot Noord-Amerika wordt *Fusarium* aarziekte in West-Europa vaak veroorzaakt door een complex van *Fusarium* schimmels, waarvan in de negentiger jaren *F. culmorum* de meest prominente soort was. Ook in deze soort werden vier chromosomen waargenomen evenals in de andere soorten van het *Fusarium* aarziekte complex.

De genetische informatie van *F. graminearum* omvat 36 Mb, terwijl de GTBM aangeeft dat deze chromosomen vrijwel gelijk in grootte zijn. Derhalve zijn deze chromosomen ieder te groot om met de Pulsed-Field Gel Electrophoresis, of PFGE zichtbaar gemaakt te worden. Bij *F. proliferatum*, die afkomstig is uit een andere sectie van het geslacht, werden twaalf chromosomen waargenomen mbv de GTBM. Uit de literatuur is bekend dat de sterk verwante soort *F. verticil-*

*lioides* twaalf koppelingsgroepen bevat, terwijl bovendien twaalf chromosomen konden worden vastgesteld met behulp van de PFGE. Deze vergelijking onderstreept de waardevolle aanvulling die de GTBM biedt op genetisch onderzoek bij (plantenpathogene) schimmels.

### *Fusarium* in granen: epidemiologie en resistentie

Gert H.J. Kema, Ruth van der Heide,  
Ineke de Vries, Theo van der Lee, Cor Schoen,  
Pieter Kastelein, Jürgen Köhl, Henk Jalink,  
Rob van der Schoor en Cees Waalwijk

Plant Research International B.V., Droevendaalsesteeg 1, P.O.Box 16, 6700 AA Wageningen. e-mail: gert.kema@wur.nl

*Fusarium* aarziekte in granen is een wereldwijd probleem. De directe opbrengstreducties zijn enorm en de indirecte verliezen door kwaliteitsproblemen en myco-toxinen zijn van een nog grotere orde. Resistentie is vanzelfsprekend een uitstekende manier om *Fusarium* problemen voor te zijn. *Fusarium* in granen wordt echter door een complex van soorten veroorzaakt. Over de resistentie tegen deze individuele soorten is weinig bekend, laat staan over het resistentiemechanisme. Het is daarom zaak eerst te achterhalen welke soorten in lokale populaties voorkomen en de kwantitatieve variatie daarvan te bepalen. Temeer omdat niet bekend is of resistentie tegen één *Fusarium* soort ook werkt tegen een andere *Fusarium* soort. Wij hebben daarom eerst een detectiemethode ontwikkeld waarmee *Fusarium* soorten kwantitatief in gewasmonsters bepaald kunnen worden. Deze methode is geschikt om diverse *Fusarium* soorten in de tijd binnen gewassen te volgen zodat een beeld wordt verkregen over de dynamiek van deze soorten binnen een seizoen. Uit het onderzoek komt naar voren dat vroeg in het seizoen *Microdochium nivale*, de sneeuwschimmel, vooral op de bladeren onder in het gewas voorkomt terwijl *Fusarium* soorten later in het seizoen het blad en de aren koloniseren. De bron voor dit inoculum is niet bekend en de ontwikkelde detectiemethode zal worden gebruikt om de epidemiologie van diverse *Fusarium* soorten tegelijkertijd door te lichten.

Resistentie tegen *Fusarium* wordt onderscheiden in diverse typen waarvan resistentie tegen penetratie en kolonisatie het belangrijkste lijken te zijn. Het onderscheid tussen de diverse typen is echter niet goed omschreven. Hierdoor is weinig tot niets bekend over de genetische basis van deze resistentietypen. Het is daarom moeilijk om resistentietypen te combineren in veredelingsprogramma's. Wij hebben daarom *Fusarium* Screen ontwikkeld. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een met GFP getransformeerd *F. culmo-*