

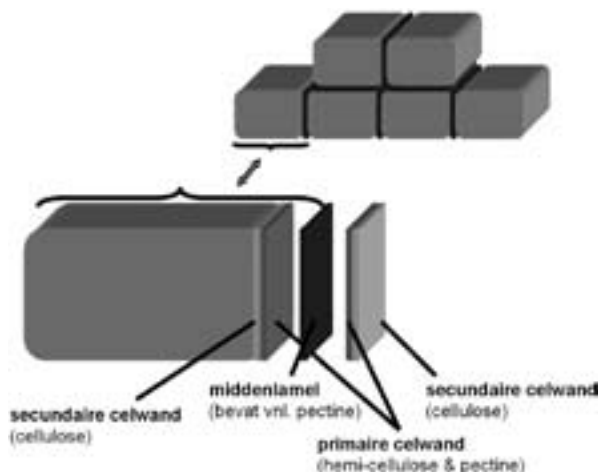
Hoe veroorzaakt *Botrytis* rot?

Ilona Kars

Op 21 september 2007 promoveerde Ilona Kars aan Wageningen Universiteit op een proefschrift getiteld 'The role of pectin degradation in pathogenesis of *Botrytis cinerea*'. Het onderzoek werd uitgevoerd bij de leerstoelgroep Fytopathologie van Wageningen Universiteit waaraan haar promotor Prof. Dr. Ir. P.J.G.M. de Wit, hoogleraar Fytopathologie, en co-promotor Dr. J.A.L. van Kan beiden verbonden zijn. Daarnaast werd samengewerkt met onderzoekers van de leerstoelgroep Schimmel Genomica van Wageningen Universiteit. Het onderzoeksproject (WGC.5034) werd gefinancierd door de Stichting Technologische Wetenschappen (STW). De volledige tekst van het proefschrift is beschikbaar in de digitale bibliotheek van Wageningen Universiteit via de link <http://library.wur.nl/wda/dissertations/dis4248.pdf>.

Inleiding

Botrytis cinerea is een schimmel die rot veroorzaakt in vele verschillende plantensoorten zoals tomaat, aardbei en roos, terwijl andere *Botrytis*-soorten zich beperken tot één soort waardplant (bijvoorbeeld *Botrytis allii* op ui of *Botrytis tulipae* op tulp). Alle *Botrytis*-soorten, specifiek of niet, zijn necrotrofen wat wil zeggen dat ze in staat zijn om waardplantcellen te doden tijdens het infectieproces. Vanaf het moment dat een spore landt op het plantenoppervlak tot aan volledige kolonisatie, scheidt de schimmel verscheidene enzymen en metabolieten uit die mogelijk bijdragen aan de virulentie. Onder de extracellulaire enzymen die worden geproduceerd tijdens de vroege stadia van de infectie zijn pectine-afbrekende enzymen die de penetratie van het plantenoppervlak en de groei van de schimmel in de middenlamel mogelijk maken. Zodoende dragen ze bij aan de afbraak van plantenweefsel en de omzetting ervan in schimmelbiomassa. Pectine is een van de belangrijkste structurele componenten van de middenlamel (Figuur 1) en kan worden afgebroken door enzymen die enerzijds het substraat kunnen afbreken (polygalacturonases, pectine- en pectaat-lyases) of anderzijds de pectinestructuur kunnen veranderen (pectine-acetylesterases en pectine-methylesterases). In eerder onderzoek werd de *B.*



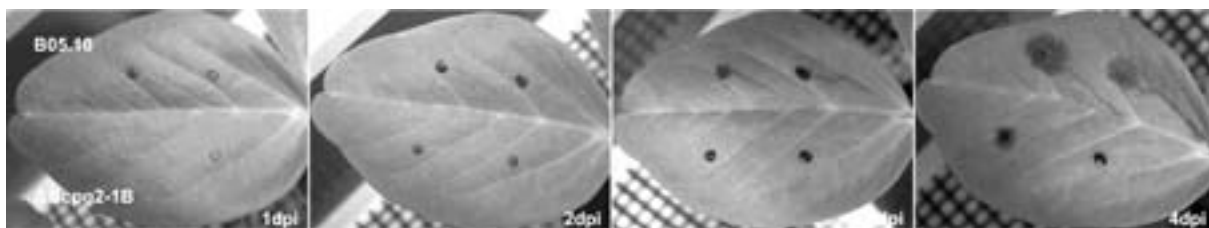
Figuur 1. De opbouw van de celwand en middenlamel van de plant.

cinerea-endopolygalacturonase (*Bcpg*) -genfamilie gekarakteriseerd en door middel van gerichte mutagenese werd aangetoond dat *B. cinerea*-mutanten waarin *Bcpg1* uitgeschakeld is, minder virulent zijn. Dit was een uitgangspunt om een vervolgonderzoek te starten om het proces van celwandafbraak door *B. cinerea* verder op te helderen.

Welke pectinase-coderende genen spelen een belangrijke rol in de infectie?

We onderzochten in welk stadium van de infectie de expressie van de verschillende *B. cinerea*-pectinasegenen aangeschakeld wordt en bepaalden welke genen een belangrijke rol spelen in de infectie d.m.v. mutanten waarin endopolygalacturonase (*Bcpg*) of pectine methylesterase (*Bcpme*) -genen waren uitgeschakeld. Als een schimmelmutant waarin één gen ontbreekt minder of geen ziekte meer veroorzaakt kunnen we concluderen dat het gen betrokken is bij de infectie. Zo toonden we aan dat het *Bcpg2*-gen een belangrijke rol speelt in de infectie, vanaf het moment dat de schimmel het plantenweefsel binnendringt. Mutante stammen waarin het *Bcpg2*-gen was uitgeschakeld waren ongeveer 24 uur vertraagd in de ontwikkeling van de eerste ziektesymptomen op het planten oppervlak

PROMOTIE



Figuur 2. Infectietoets van *Botrytis cinerea*-stam B05.10 (wild-type) en de mutante stam Δ Bcpg2 op bonenblad. Vier druppels met sporen werden geplaatst op het blad. De wild-typestam infecteert al op de eerste dag na infectie (1dpi) en groeit snel verder uit. De mutant waarin het Bcpg2-gen is uitgeschakeld geeft pas na twee dagen de eerste ziektesymptomen en groeit veel langzamer uit

(Figuur 2) en de snelheid waarmee deze lesies uitgroeiden was met 50 tot 85% afgenomen. De andere geteste genen speelden geen aantoonbare rol tijdens de infectie.

Waarom heeft *Botrytis* een familie van endopolygalacturonases (BcPGs)?

In eerder onderzoek werd de genfamilie van zes *B. cinerea*-endopolygalacturonases gekarakteriseerd en de verschillen tussen elk van de genen bestudeerd. Elk gen codeert voor een enzym, dus bestaat er ook een hele familie van enzymen. Dit leidde tot de vragen: 'Waarom heeft *Botrytis* een familie van BcPGs?', 'Zijn er verschillen in de eigenschappen van elk van de enzymen?' en 'Spelen ze elk een specifieke rol tijdens de infectie en afbraak van plantenweefsel?'. Om deze vragen te beantwoorden hebben de collega's van de leerstoelgroep Schimmel Genomica de BcPGs geproduceerd en gezuiverd zodat we elk van de enzymen apart konden bestuderen. Zo werd aangetoond dat de BcPG-enzymen verschillen in biochemische eigenschappen en dat ieder enzym pectine op geheel eigen wijze kan afbreken. We testten verder welk van de BcPGs schade kon veroorzaken in gezond plantenweefsel, door afbraak van de plantecelwand. Met name BcPG1 en BcPG2 konden veel schade veroorzaken. Maar was het werkelijk de enzymatische activiteit van de BcPGs die schade veroorzaakte of was het een afweerreactie van de plant (zgn. overgevoeligheidsreactie waarbij een plant eiwitten herkent en haar eigen cellen doodt)? Dit testten we door de schade te vergelijken na behandeling van gezond plantenweefsel met actief BcPG2 en inactief BcPG2 (Figuur 3) en daaruit bleek dat de zichtbare beschadiging van het plantenweefsel werd veroorzaakt door de enzymatische activiteit van BcPG2 en niet door een (afweer)reactie op de herkenning van het BcPG2-eiwit. De enzymen BcPG3, BcPG4, BcPG5 en BcPG6 konden in sommige planten wel schade veroorzaken en in andere planten niet, en de schade was in het algemeen minder dan bij BcPG1 en BcPG2.

Beschikken planten over een afweermecanisme?

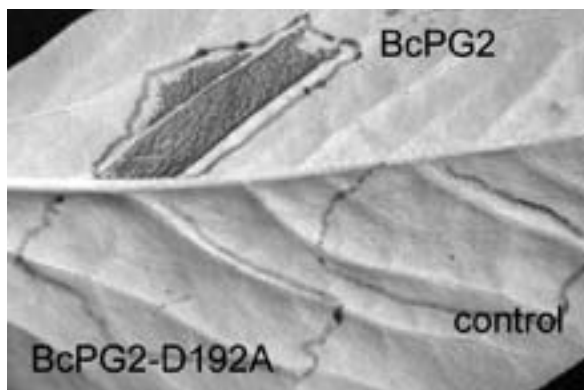
Natuurlijke variatie in de weerbaarheid van planten tegen de *B. cinerea*-polygalacturonases kan helpen om een afweermecanisme te identificeren tegen rot, wat gebruikt zou kunnen worden om *B. cinerea*-resistente planten te ontwikkelen. In eerste instantie testten we daarom of er natuurlijke variatie bestond tussen *Arabidopsis* (zandraket) -planten van verschillende geografische origine. Die variatie vonden we onder andere tussen *Arabidopsis*-genotypen uit de Verenigde Staten en Tsjechië. De eerstgenoemde planten vertoonden veel schade (dood weefsel) na infiltratie van BcPG-enzymen; de laatstgenoemde planten vertoonden geen schade en waren resistent. De natuurlijke variatie van *Arabidopsis*-planten in hun respons op infiltratie van BcPGs werd genetisch geanalyseerd in de nakomelingen van een kruising tussen deze twee ouders. De resistentie tegen schade veroorzaakt door BcPGs splitste in de nakomelingen uit als een monogene, recessieve eigenschap, waarvan het gen lag op chromosoom 3 van *Arabidopsis*. Recent is vervolgonderzoek gestart om de verantwoordelijke genen op te sporen, te isoleren en de rol daarvan in resistentie tegen *B. cinerea* te onderzoeken.

In het kort: Hoe veroorzaakt *Botrytis* rot?

Als een spore is geland op het plantoppervlak, scheidt *B. cinerea* enzymen en metabolieten uit waaronder pectine-afbrekende enzymen zoals de zes endopolygalacturonases (BcPGs). Elk van deze BcPGs breken pectine uit de plantencelwanden en middenlamel op hun eigen wijze af. Als een soort pac-mannetjes knippen ze pectine in kleinere fragmenten. Die pectinefragmenten fungeren waarschijnlijk als voedingsbron voor de schimmel. Pectine zit verweven in de plantencelwanden en zorgt voor flexibiliteit van de cellen en de

stabiliteit van de structuur van een weefsel. Op het moment dat pectine wordt afgebroken door BcPG1 of BcPG2 wordt de verbinding tussen plantencellen verbroken, verliezen de celwanden hun flexibiliteit en het weefsel daarmee haar stabiliteit. Wij hebben dat waargenomen doordat het plantenweefsel ineens zakt na behandeling van bonenblad met BcPG1 (niet op foto) en BcPG2 (Figuur 3). Door middel van de BcPGs is *B. cinerea* dus in staat het plantoppervlak van een gezonde plant binnen te dringen, door de middenlamel te groeien en plantenweefsel om te zetten in schimmelbiomassa en zodoende rot te veroorzaken.

Ilona Kars is bereikbaar via karsilona@gmail.com. Het Botrytis-onderzoek aan Wageningen Universiteit wordt geleid door Dr. Jan A.L. van Kan en hij is te bereiken via jan.vankan@wur.nl.



Figuur 3. Tuinboonblad behandeld met actief (BcPG2) en geïnactiveerd (BcPG2-D192A) Botrytis cinerea-endo-polygalacturonase 2. Schade aan het blad (ineengezakt weefsel met een nattig uiterlijk) is alleen zichtbaar na behandeling met het actieve BcPG2. Dit wijst erop dat schade wordt veroorzaakt door de enzymactiviteit en niet door een overgevoeligheidsreactie van de plant op de aanwezigheid van het eiwit.

PROMOTIE

De Koninklijke Nederlandse Plantenziektkundige Vereniging roept kandidaten op voor de functie van

Voorzitter KNPV

Omdat de laatste zittingstermijn van onze huidige voorzitter Gert Kema eind dit jaar afloopt is de KNPV op zoek naar een nieuwe voorzitter. Vanwege de spilfunctie die een voorzitter heeft binnen onze vereniging is onderstaand functieprofiel opgesteld:

De voorzitter (m/v) is:

- Een netwerker en samenbinder.
- Representatief voor de gehele KNPV, met sterke voeling voor de praktijk.
- In staat buiten de eigen werkomgeving te kijken en te denken.
- Een professionele procesbegeleider.
- Een strategische denker met visie op de rol van gewasbescherming in de samenleving.
- Een natuurlijke leider met een krachtige en energieke uitstraling.

De voorzitter van de KNPV is in staat om bruggen te bouwen en draagt actief bij aan het profiel en de visie van de vereniging. Hij/zij is in staat om scholieren en studenten te interesseren voor de gewasbescherming en initieert activiteiten met een nationale uitstraling. Hij/zij geeft leiding aan het bestuur en de staf van de KNPV en vormt met de secretaris en de penningmeester het dagelijks bestuur. Hij/zij is nauw betrokken bij de organisatie van bijeenkomsten en is het gezicht en de vertegenwoordiger van de vereniging in internationaal verband.

De zittingstermijn voor elk KNPV-bestuurslid is in principe drie jaar; een termijn kan eenmaal, en in bijzondere gevallen tweemaal, worden verlengd. Het bestuur van de KNPV roept kandidaten op om te reageren. Indien u interesse hebt in deze functie kunt u dit kenbaar maken aan onze secretaris Jan Bouwman (Jan.Bouwman@syngenta.com). Voor verdere informatie kunt u contact opnemen met de huidige voorzitter Gert Kema (tel. 0317-480632).