

Botrytis-soorten op bloembolgewassen

Martijn Staats en Jan van Kan

Op 15 januari 2007 promoveerde Martijn Staats aan Wageningen Universiteit op een proefschrift getiteld 'Botrytis species on flower bulb crops: phylogeny, genetic variation and host specificity.' Het onderzoek werd uitgevoerd bij de leerstoelgroep Fytopathologie van Wageningen Universiteit met als promotor Prof. Dr. Ir. P.J.G.M de Wit, hoogleraar Fytopathologie, en co-promotor Dr. J.A.L. van Kan. De volledige tekst van het proefschrift is beschikbaar in de digitale bibliotheek van Wageningen Universiteit via de link <http://library.wur.nl/wda/dissertations/dis4113.pdf>.

Schimmels van het geslacht *Botrytis* (teleomorf *Botryotinia*) kunnen ernstige schade veroorzaken in een groot aantal siergewassen. Met uitzondering van *B. cinerea* zijn alle *Botrytis*-soorten die pathogeen zijn op bloembolgewassen waardplantspecifiek, d.w.z. elke soort is in staat om slechts één of meer nauw-

verwante waardplantsoorten te infecteren. Dit onderzoek richtte zich voornamelijk op de economisch belangrijke soorten *B. elliptica* en *B. tulipae*, de veroorzakers van 'vuur' in respectievelijk lelie en tulp.

Betere indeling door genetische merkers

Identificatie van *Botrytis*-soorten op morfologische kenmerken is niet altijd eenvoudig. Om een eenduidige identificatie van *Botrytis*-soorten mogelijk te maken en om de genetische variatie binnen soorten te bestuderen, zijn moleculaire merkers ontwikkeld.

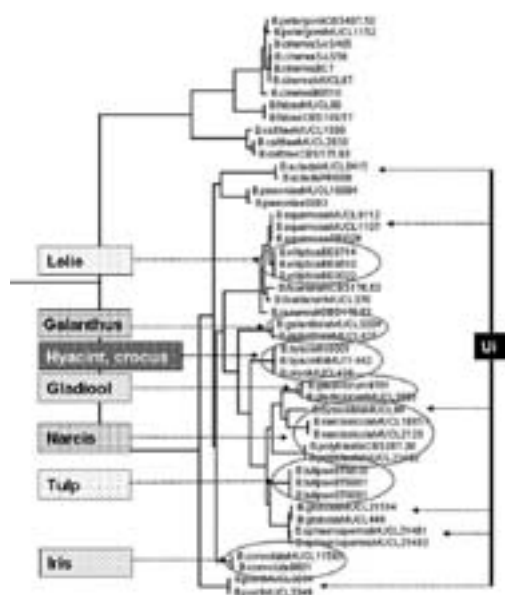
Op basis van de genetische code (DNA-sequentie) van drie eiwitcoderende genen (*RPB2*, *G3PDH* en *HSP60*) is een nieuwe indeling van het geslacht *Botrytis* gemaakt. Deze moleculair-fylogenetische analyse omvatte alle 22 soorten van het geslacht *Botrytis*, en bevestigde de klassieke soortindeling. Daarnaast werd de eerder voorgestelde hybride-status van *B. allii* (*B. byssoidea* X *B. aclada*) bevestigd.

Een vergelijking tussen de fylogenieën van de *Botrytis*-soorten en de waardplanten (Figuur 1) suggereert dat in veel gevallen geen co-evolutie is opgetreden van pathogenen en hun gastheren.

Van twee *Botrytis*-soorten die fylogenetisch sterk verwant zijn was één (*B. aclada*) een pathogeen van een monocotyl (ui) en de ander (*B. paeoniae*) van een dicotyl (pioenroos). Twee soorten die geïsoleerd zijn van Ranunculaceae (dicotylen) waren sterk verwant aan soorten die lelie en ui infecteerden.

De zes *Botrytis*-soorten die ui (*Allium* spp.) kunnen infecteren waren verspreid over de fylogenetische boom. Mogelijk hebben er gedurende de *Botrytis*-soortvorming sprongsge wijze veranderingen in de waardreeks plaatsgevonden.

Verwantschap *Botrytis* in bolgewassen



Figuur 1. Verwantschap van *Botrytis*-soorten. Aangegeven zijn de soorten in bolgewassen.

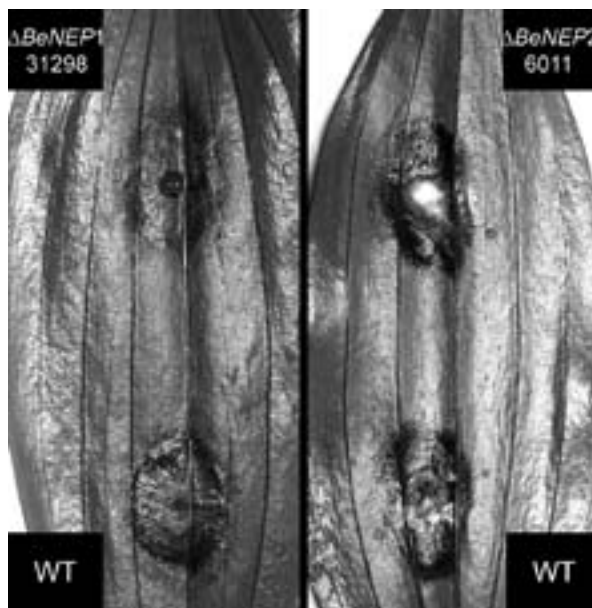
PROMOTIE

Voortplanting van 'vuur'-veroorzakende schimmels

Met 'amplified fragment length polymorphism' (AFLP) -analyse werd de genotypische diversiteit van veldisolaten van *B. elliptica* en *B. tulipae* bepaald. Aan de hand van de AFLP-data werd ook geanalyseerd of deze soorten zich seksueel of asexueel voortplanten. Isolaten werden bemonsterd gedurende opeenvolgende groeiseizoenen in proefvelden in Lisse en op andere locaties in Nederland. De genotypische diversiteit van *B. elliptica* was hoog en klonen werden alleen binnen groeiseizoenen gevonden. Analyse van 'linkage disequilibrium' (een maat om niet-random verdeling van genen mee uit te drukken) toonde aan dat er genetische recombinatie in het veld heeft plaatsgevonden, die het gevolg is van seksuele reproductie. *B. tulipae* heeft daarentegen een hoofdzakelijk klonale populatiestructuur zoals blijkt uit de lage genotypische diversiteit in monsters afkomstig van diverse plaatsen en uit verschillende jaren, en de sterke multilocus-associaties. De hoeveelheid linkage disequilibrium was echter lager dan verwacht mag worden voor een strikt klonaal organisme. Het is niet uit te sluiten dat recombinatie binnen de *B. tulipae*-populatie heeft geleid tot het ontstaan van nieuwe genotypen.

NLP-eiwitten en virulentie op lelie

Alle *Botrytis*-soorten veroorzaken celdood in hun waardplant, en er wordt aangenomen dat ze daarbij gebruik maken van fytoxische metabolieten en eiwitten. Een groep fytoxische eiwitten die in schimmels, oomyceten en bacteriën voorkomt zijn de 'Nep1-like proteïns' (NLPs). Twee NLP-coderende genen, genaamd *NEP1* en *NEP2*, waren aanwezig in alle *Botrytis*-soorten. De overeenkomsten in de DNA-code tussen *NEP1* en *NEP2* waren echter laag, wat waarschijnlijk wijst op verschillende functies. In *B. elliptica* zijn deze functies onderzocht met mutanten waarin



Figuur 2. Mutanten van *B. elliptica* waarin het gen *NEP1* of *NEP2* was uitgeschakeld, waren op lelie even virulent als wild-type (WT)-isolaten.

BeNEP1 of *BeNEP2* was uitgeschakeld. Deze mutanten vertoonden normale virulentie op lelieblad (Figuur 2). Bovendien waren kunstmatig geproduceerde *B. elliptica*-NLPs niet toxisch voor monocotylen, inclusief lelie. Deze resultaten tonen aan dat NLPs geen essentiële virulentiefactoren zijn en dat ze niet functioneren als waardplant-specifieke toxines voor *B. elliptica*.

Het onderzoek heeft nieuwe inzichten in de verwantschap, evolutie en wijze van reproductie van *Botrytis*-soorten. De factoren die een belangrijke rol spelen in virulentie en waardplant specificiteit zijn nog niet ontrafeld.

Dr. Martijn Staats werkt momenteel bij Wageningen Universiteit bij de leerstoelgroep Biosystematiek en is te bereiken via martijn.staats@wur.nl. 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.

PROMOTIE

Samenvatting

De onderlinge verwantschap en populatie-opbouw van *Botrytis*-soorten is onderzocht met moleculaire merkers. Er bleek geen relatie te bestaan tussen de verwantschap van de schimmels en hun waardplantsoort. *Botrytis*-soorten die 'vuur' kunnen veroorzaken in bolgewassen planten zich verschillend voort: *B. elliptica* seksueel en *B. tulipae* asexueel. Twee eiwitten die in alle *Botrytis*-soorten voorkomen bleken in *B. elliptica* niet essentieel te zijn voor virulentie op lelie.