

Plantenafweer in tomaat tegen *Botrytis cinerea*

Katrien Curvers en Monica M.R. Höfte

Laboratorium voor Fytopathologie, Vakgroep Gewasbescherming, Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen, UGent, Coupure Links 653, 9000 Gent; e-mail: Katrien.Curvers@ugent.be; Monica.Hofte@ugent.be

Inleiding

Grijsrot, veroorzaakt door de necrotrofe schimmel *Botrytis cinerea*, is één van de meest verbreide ziekten bij groenteteelt onder glas. Een hoge luchtvochtigheid samen met gematigde temperatuur bevorderen aantasting, en infectie vindt meestal plaats via wondjes in het plantenweefsel. In tomaat, de belangrijkste glasgroente in Nederland en België, is grijsrot de ziekte die de grootste economische verliezen veroorzaakt. Stengelinfecties komen het meest voor, maar oude of verwonde bladeren kunnen ook aangeast worden. In tegenstelling tot de meeste andere ziekten bij tomaat kan een *Botrytis*-infectie die niet tijdig behandeld wordt, leiden tot het afsterven van de volledige plant. In het laboratorium voor Fytopathologie aan de Universiteit Gent wordt al jaren onderzoek verricht naar de afweer van tomaat tegen *B. cinerea*.

Plantenhormonen en plantenafweer

Plantenhormonen hebben naast hun functie in groei en ontwikkeling ook een rol in de afweerrespons van de plant tegen belagers zoals insecten en schimmels. Vaak zijn ze betrokken in de signalisatiewegen die de afweerreacties activeren en in goede banen leiden. Over het algemeen wordt aangenomen dat salicylzuur (SA) een positieve rol speelt in de resistentie tegen biotrofe pathogenen die enkel op levend plantenweefsel kunnen overleven. Jasmijnzuur (JA) en ethyleen (ET) spelen doorgaans een rol in de resistentie tegen necrotrofe schimmels, die dood plantmateriaal prefereren. Uiteraard bestaan hierop uitzonderingen. Beide hormonale 'pathways' interfereren ook met elkaar, waarbij ze elkaar doorgaans onderdrukken. We kunnen ons de rol van fytohormonen in afweer dus het beste voorstellen als een complex regulerend netwerk in plaats van als geïsoleerde signalisatiewegen die elk een eigen effect uitoefenen. Naast deze best

gekende en meest beschreven hormonen, is de laatste jaren duidelijk geworden dat ook andere plantenhormonen een rol spelen in de afweer tegen pathogenen. Zo blijkt abscissinezuur (ABA) ook betrokken te zijn bij plantenafweer. ABA is voornamelijk gekend om zijn rol in wondrespons en processen zoals kiemrust, bladval en het sluiten van de huidmondjes, bijvoorbeeld als reactie op droogtestress. De werking van ABA in plantenafweer tegen pathogenen is echter zeer ambivalent: het kan resistentie tegen biotrofen en necrotrofen zowel positief als negatief beïnvloeden, specifiek afhankelijk van de plant-pathogeeninteractie. Data van verschillende studies suggereren dat timing van de infectie bepalend zou zijn voor de rol van ABA in de afweerrespons.

Rol van abscissinezuur in de afweer van tomaat tegen *Botrytis*

In tomaat blijkt ABA een negatieve rol te spelen in de afweer tegen *Botrytis* (Audenaert *et al.*, 2002). De zogenaamde *sitiens*-mutant, die beduidend minder ABA aanmaakt dan de wild-type plant, bleek veel resistenter te zijn tegen de schimmel. Bovendien werden planten die exogeen ABA toegediend kregen gevoeliger. Verder onderzoek bracht aan het licht dat ABA in tomaat de SA-afhankelijke signalisatie onderdrukt, en dat mutanten met lagere SA-gehalten ook gevoeliger werden voor *Botrytis*. Hieruit bleek dat in tomaat de afweer tegen *Botrytis* voornamelijk gereguleerd wordt door SA, een hormoon dat doorgaans een rol speelt in afweer tegen biotrofe schimmels. Bovendien wordt de SA-afhankelijke afweer in deze interactie op zich beïnvloed door het basale ABA-niveau in de plant (Figuur 1).

ARTIKEL

Rol van waterstofperoxide in de afweer

Niet alleen hormonen spelen een rol in de signalisatie die nodig is om afweerreacties in de cel te activeren na de herkenning van de schimmel aan het plantoppervlak. Eén van de eerste verbindingen die gevormd worden in de celwand van de plant en die een belangrijke rol spelen in de overgevoeligheidsreactie die optreedt wanneer een plant een pathogeen herkent, is waterstofperoxide (H_2O_2). H_2O_2 is een reactieve zuurstofverbinding die bij ongecontroleerde productie veel schade kan veroorzaken aan een cel. In plantenafweer kan ze ingezet worden om lokaal celdood te veroorzaken tijdens de HR waardoor de meeste pathogenen verhinderd kunnen worden verder in het plantenweefsel door te dringen. In het geval van necrotrofe schimmels, die leven van dood weefsel, wordt aangenomen dat een dergelijke lokale celdood juist voordelig is voor het pathogeen. In het geval van de afweer van tomaat tegen *Botrytis* blijkt echter dat een tijdige productie van H_2O_2 wel degelijk een positief effect heeft op de resistentie (Asselbergh *et al.*, 2007). De *sitiens*-mutant reageerde op *Botrytis*-infectie met een productie van H_2O_2 in de epidermale cellaag. Deze respons vond 4 tot 8 uur na inoculatie plaats, nog vóór de schimmel de plant binnendringt. In de wild-type plant werd ze slechts veel later in gang gezet (24 uur na inoculatie) en ging de H_2O_2 -accumulatie gepaard met celdood en verspreiding van de infectie. Dit wijst erop dat de timing van de H_2O_2 -accumulatie bepalend

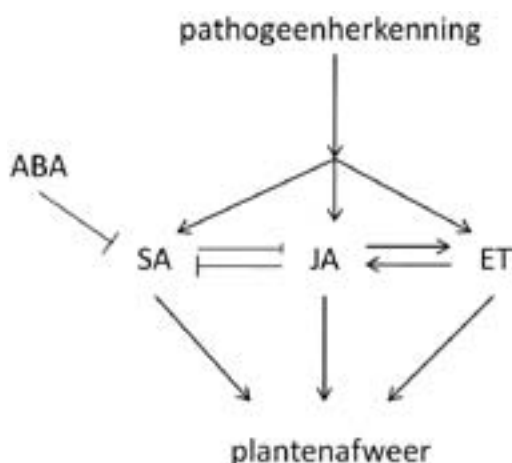
is voor de uitkomst van de interactie. Wanneer de H_2O_2 -productie verhinderd werd bleek de resistentie in *sitiens* volledig teniet gedaan. H_2O_2 speelt naast haar rol in signalisatie ook een rol in polymerisatie van celwandmoleculen wat resulteert in een verstevigde celwand die moeilijker verteerbaar is door de schimmel. Dit proces van celwandversteviging bleek een onmisbare rol te spelen in de resistentie van de *sitiens*-mutant tegen *Botrytis*.

Verhoogde staat van alertheid in ABA-negatieve mutant

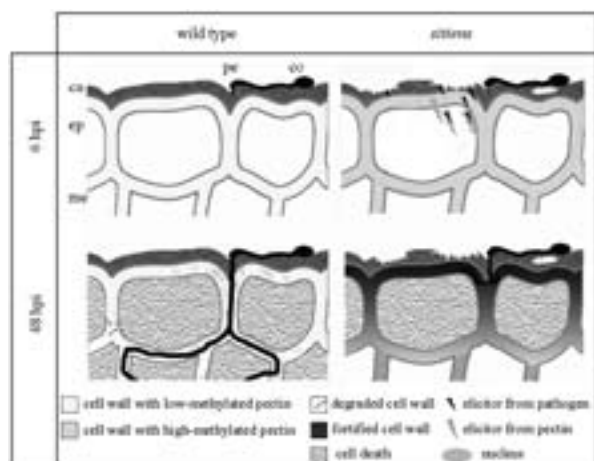
Microarray-analyse van de genexpressie na *Botrytis*-infectie in *sitiens* en wild-type tomaat, toonde aan dat verschillende genen die betrokken zijn bij plantenafweer tegen pathogenen, zoals ondermeer 'pathogenesis-related' of PR-genen, een verhoogde basale expressie vertonen in de ABA-deficiënte mutant (Asselbergh *et al.*, 2007). Deze planten brengen dus constitutief een afweerreactie tot expressie wat veroorzaakt zou kunnen worden door de stress die het abnormaal lage ABA-gehalte induceert. Verder was de expressie van afweerge relateerde genen hoger 8 uur na infectie in de mutant dan in de wild-type planten, wat erop wijst dat deze planten hun afweer sneller en/of efficiënter kunnen activeren.

Een rol voor de celwand in de resistentie van *sitiens*

Daar de ABA-mutant constitutief afweergenen tot expressie brengt en de defensierespons na infectie veel sneller activeert, onderzochten we of er een verschil in de celwand bestaat, de eerste barrière die de schimmel moet doorbreken alvorens ze het weefsel kan infecteren. We wilden nagaan of eventuele verschillen konden verklaren waarom de ABA-deficiënte mutant sneller kan reageren op infectie. Onderzoek wees uit dat de cuticula van de mutant meer permeabel is (Curvers *et al.*, 2010). Hierdoor kunnen elicitors afkomstig van *Botrytis* sneller door de celwand diffunderen en de defensierespons in gang zetten. Bovendien kunnen fragmenten van de cuticula zelf waargenomen worden door de plant, die hierop haar afweer kan verhogen, zoals ook de genexpressie-experimenten suggereerden. Verder bleek ook de samenstelling van de pectine-fractie van de celwand verschillend tussen *sitiens* en wild-type planten. Pectine is een belangrijke celwandcomponent die de lijm tussen de cellen vormt.



Figuur 1. Vereenvoudigde weergave van de interactie tussen plantenhormonen in de afweer van planten tegen pathogenen. JA en ET hebben een positieve invloed op elkaar, en onderdrukken SA-afhankelijke signalisatie. ABA heeft een onderdrukkende werking op SA.



Figuur 2. Schematische voorstelling van de eerste afweerreacties in sitiens en wild-type tomaat tegen *Botrytis*. In sitiens worden elicitoren afkomstig van de plant of de schimmel sneller herkend door de plant doordat ze sneller diffunderen door de meer permeabele cuticula. Hierdoor vindt een snelle H_2O_2 -accumulatie plaats in de celwanden van de epidermiscellen waardoor deze verstevigd worden en verdere *Botrytis*-groei geremd wordt. In wild-type tomaten gebeurt deze snelle respons niet en gaat H_2O_2 -accumulatie gepaard met necrose en verspreiding van de schimmel. co: conidium, pe: penetratiestructuur, cu: cuticula, ep: epidermis, hpi: uren na inoculatie, me: mesofyl.

Het is voornamelijk opgebouwd uit lange ketens van de suiker galacturonzuur, waarop vertakkingen van suikermoleculen voorkomen, en methylgroepen die enzymatische afbraak vertragen. Bij infectie scheidt *Botrytis* een reeks enzymen uit die de celwand afbreken, waaronder pectinasen. De afbraakmoleculen die hierbij vrijkomen, de zogenaamde oligogalacturoniden, fungeren in de plant als signaal om de defensierespons te activeren. De elicitor-capaciteit van de oligogalacturoniden is afhankelijk van hun lengte, die weer bepaald wordt door het methylatiepatroon van het galacturonzuur. De *sitiens*-mutant vertoont een lichtjes hogere methylatie dan de wild-type planten, waardoor dus efficiëntere signaalmoleculen gevormd zouden kunnen worden. Analyse van de suiker-signaalmoleculen die vrijgesteld werden in *sitiens* and wild-type planten toonde aan dat deze inderdaad verschillend waren in *sitiens*, en vroeger vrijgesteld werden. Dit alles wijst erop dat in deze planten meer effectieve signaalmoleculen kunnen gevormd worden die sneller door de permeabele cuticula kunnen diffunderen waardoor afweer sneller op gang komt (Curvers *et al.*, 2010).

Samenvatting en toepassing

Uit onderzoek van een tomatenmutant, de *sitiens*-mutant, bleek dat een verlaagd ABA-gehalte in tomaat zorgt voor een verhoogde resistentie tegen *Botrytis*. Het normale ABA-niveau in tomaat blijkt de SA-afhankelijke afweer te onderdrukken, waardoor afweerreacties zoals H_2O_2 -accumulatie en celwandversteviging te laat op gang komen om *Botrytis*-infectie te kunnen onderdrukken. Bovendien leidt ABA-deficiëntie tot veranderingen in de celwand van de plant waardoor signaalmoleculen sneller en efficiënter

waargenomen kunnen worden door de plant (Figuur 2). Een verlaagd ABA-gehalte heeft dus meerdere verschillende effecten in de plant, die er samen voor kunnen zorgen dat de *sitiens*-mutant resistentier wordt tegen *Botrytis*. Het verlaagde ABA-niveau zorgt er echter ook voor dat deze planten gevoeliger zijn voor droogtestress, waardoor ze op zich niet kunnen gebruikt worden in kweekprogramma's. Door onderzoek te doen op deze planten kan achterhaald worden welke mechanismen ervoor zorgen dat ze resistentier worden, waardoor een waardevolle kennis bekomen wordt die op termijn ingezet kan worden om *Botrytis*-resistentie in planten te introduceren.

Literatuur

- Audenaert K, De Meyer GB & Höfte MM (2002) Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiology* 128: 491-501
- Asselbergh B, Curvers K, França SC, Audenaert K, Vuylsteke M, Van Breusegem F & Höfte M (2007) Resistance to *Botrytis cinerea* in *sitiens*, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiology* 144: 1863-1877
- Curvers K, Seifi H, Mouille G, De Rycke R, Asselbergh B, Van Hecke A, Vanderschaeghe D, Höfte H, Callewaert N, Van Breusegem F, Höfte M (*in druk*) ABA-deficiency causes changes in cuticle permeability and pectin composition that influence tomato resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, Published online on August 13, 2010, as DOI:10.1104/pp.110.158972