

ABC transporters van *Botrytis cinerea* in biotische en abiotische interacties

HJ Schoonbeek

Op 29 november 2004 promoveerde Henk-jan Schoonbeek aan Wageningen Universiteit op het proefschrift getiteld 'ABC transporters from *Botrytis cinerea* in biotic and abiotic interactions'. Promotor was Prof. dr. ir. P.J.G.M. de Wit en co-promotor was dr. ir. M.A. de Waard, leerstoelgroep Fytopathologie, Wageningen Universiteit.

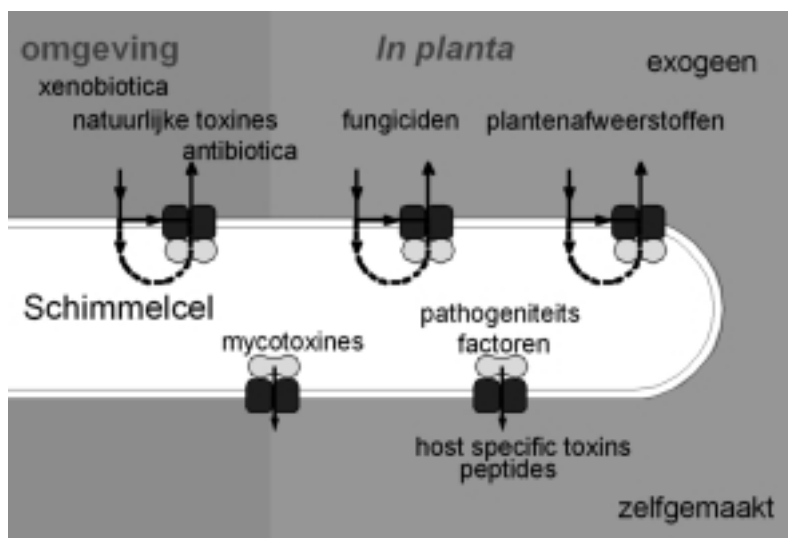
Inleiding

Botrytis cinerea veroorzaakt de grauwe schimmelziekte op een groot aantal gewassen. Het is een pathogene schimmel met een hoog aanpassingsvermogen die moeilijk te bestrijden is, vooral omdat er weinig resistentie tegen deze schimmel in genetische bronnen aanwezig is en de schimmel gemakkelijk resistentie ontwikkelt tegen chemisch niet-verbante fungiciden. De levenscyclus van de schimmel, pathogenese,

beheersmaatregelen en resistentie tegen fungiciden worden in dit proefschrift beschreven. De wijze waarop actieve exportsystemen met een lage specificiteit kunnen bijdragen aan verminderde gevoeligheid van *B. cinerea* voor fungitoxische verbindingen wordt in detail behandeld. De belangrijkste voorbeelden van deze exportsystemen zijn eiwitten die behoren tot de superfamilies van ATP-binding cassette (ABC) en "major facilitator superfamily" (MFS) transporters. Deze eiwitten kunnen actief fungi-

toxische verbindingen uit het cytoplasma verwijderen en verlagen daarmee de intracellulaire concentratie van deze verbindingen tot een subleetaal niveau. De energie die benodigd is voor transport wordt door ABC transporters direct gegenereerd door hydrolyse van ATP en door MFS transporters verkregen uit de protonen gradiënt. Transporteiwitten met een rol in pleiotrope resistentie tegen fungitoxische verbindingen zijn vooral beschreven in *Saccharomyces cerevisiae*. Informatie over ABC transporters in filamenteuze schimmels is daarentegen zeer beperkt. Het doel van dit onderzoek betreft een functionele analyse van transporters in *B. cinerea* bij bescherming tegen fungitoxische verbindingen van natuurlijke en synthetische oorsprong.

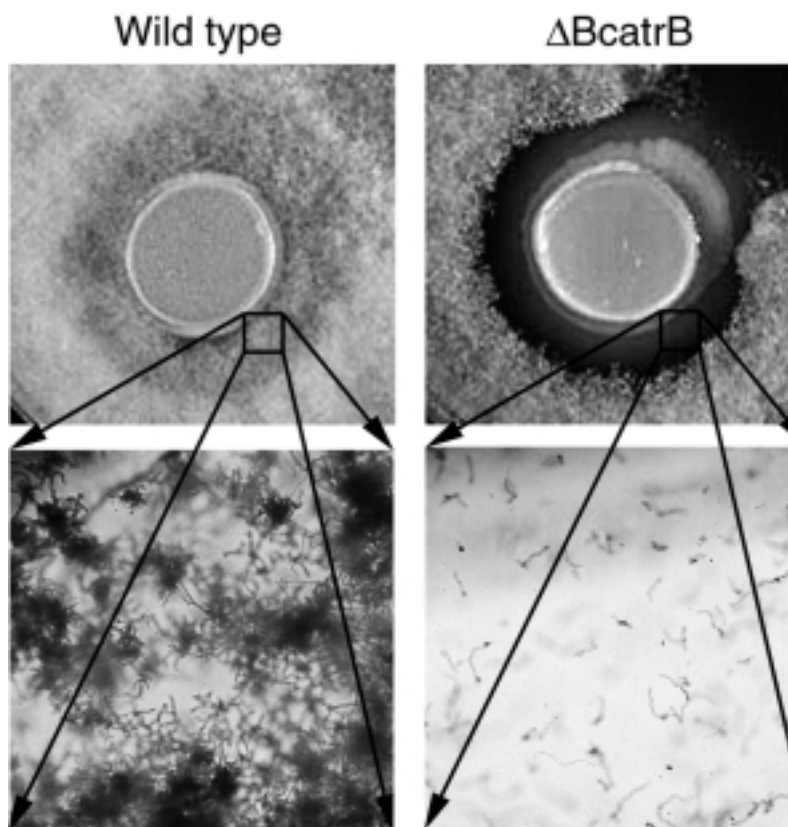
PROMOTIES



Figuur 1. Schematische weergave van een schimmeldraad met daarin aangegeven de verschillende functies van ABC-transporters. De ABC transporter *BcatrB* is een ware multidrug transporter en kan stoffen uit verschillende klassen transporteren, onder andere het fungicide fludioxonil, de plantenafweerstoffen resveratrol en eugenol, als well phenazine antibiotica geproduceerd door antagonistische bacteriën.

ABC transporters in *B. cinerea*

Een fragment van het gen voor de goed gedocumenteerde ABC transporter PDR5 uit *S. cerevisiae* werd in eerste instantie gebruikt voor het opsporen van homologe sequenties in een genomische bank van *B. cinerea*. Door middel van heterologe hybridisatie zijn twee potentiële ABC transporter genen gevonden, *BcatrA* en *BcatrB*. Het eiwit waar *BcatrB* voor codeert is inderdaad een ABC transporter en heeft een lengte van 1439 aminozuren. De expressie van *BcatrB* werd verhoogd na incubatie van mycelium met diverse fungitoxische verbindingen.



Figuur 2. Antagonistische activiteit van fenazine-producent *Pseudomonas chlororaphis* stam PCL1391 tegen *Botrytis cinerea* wildtype stam B05.10 en tegen *BcatrB* mutant *_BcatrB5* in een agardiffusie test. Effecten van *P. chlororaphis* PCL1391, geënt in het centrum van de voedingsbodem, op myceliumgroei van *B. cinerea* is te zien in de bovenste panelen en de effecten op sporenkieming (400 \times vergroting) in de onderste panelen. De resultaten laten zien dat myceliumgroei van de *BcatrB* mutant duidelijk meer geremd wordt dan de groei van de wildtype stam van *B. cinerea*. Uit deze en andere resultaten beschreven in het proefschrift blijkt dat de ABC transporter *BcatrB* de schimmel *B. cinerea* kan beschermen in interacties met bacteriën die fenazine antibiotica produceren.

Genvervangingsmutanten vertoonden verhoogde gevoeligheid voor het fenylpyrrool fungicide fenpiclonil en het fytoalexine resveratrol uit druif, hetgeen een rol van *BcatrB* in zowel resistentie tegen fungiciden als in virulentie doet veronderstellen. Vervolgens werden in een bibliotheek van “expressed sequence tags” (ESTs) met 6000 cDNA klonen van *B. cinerea*, gekweekt onder stikstoflimiterende omstandigheden, twaalf ABC en drie MFS genen gevonden. Het proefschrift beschrijft vervolgens de klonering van de corresponderende genomische fragmenten uit *B. cinerea* B05.10.

Expressie ABC transporters

De expressie van *BcatrA*, *BcatrB* en de transporter genen ontdekt in de EST bibliotheek werd bestudeerd in onbehandeld mycelium en in mycelium blootgesteld aan fungiciden uit verschillende chemische groepen. Veel stoffen induceerden op verschillende wijze de expressie van ABC en MFS transporter genen. De meest opvallende resultaten werden gevonden voor *BcatrB*, dat sterk wordt geïnduceerd door het fenylpyrrool fungicide fludioxonil en een verhoogd expressieniveau vertoont in het fenylpyrrool-resistente isolaat CH1.7.

BcatrB expressie vertoonde een hoge correlatie met de gevoeligheid van de geteste isolaten en hun vermogen om deze verbinding uit te scheiden. De expressie van de geïdentificeerde ABC en MFS transporter genen werd tevens bestudeerd na behandeling met azool fungiciden. *BcatrD* werd het sterkst geïnduceerd in wild-type isolaten B05.10 and B3 na behandeling met het azool fungicide oxpoconazool en heeft een hoog basaal expressie niveau in de azool-resistente isolaten G25 en G66. Studies met deze mutanten geven aan dat *BcatrD* een belangrijke rol speelt in de gevoeligheid van *B. cinerea* voor azool fungiciden. Isolaten die *BcatrD* sterk tot expressie brengen vertoonden verminderde gevoeligheid en lagere accumulatie-niveaus voor oxpoconazool. *BcatrD*-overexpressie-mutanten van isolaat B05.10 accumuleerden ook minder oxpoconazool en bezaten eveneens een verminderde gevoeligheid voor azolen. *BcatrD*-genvervangingsmutanten van B05.10 vertoonden juist het tegenovergestelde fenotype.

Natuurlijke rol van ABC transporters

De natuurlijke rol van ABC transporters tijdens saprofytische groei en pathogenese werd bestudeerd door expressie-analyse van ABC en MFS transporter genen na behandeling met plantenafweerstoffen en antibiotica. Vooral de expressie van *BcatrB* werd sterk geïnduceerd door plantenafweerstoffen, zoals camptothecine, eugenol, psoralen, resveratrol en rishitine. *BcatrB* genvervangingsmutanten vertoonden verhoogde gevoeligheid voor eugenol, maar de virulentie op basilicum, een waardplant van *B. cinerea* die eugenol kan produceren, was vergelijkbaar met het wildtype. De rol van *BcatrA* en *BcatrB* in virulentie werd bestudeerd met behulp van gen-

vervangingsmutanten en vergeleken met die van het moederisolaat B05.10 op waardplanten uit de families der Leguminosae en Solanaceae. Er werd alleen een significante vermindering in virulentie van *BcatrB* genvervangingsmutanten geconstateerd op tomaat. Deze resultaten geven aan dat de multidrug transporteur BcatrB als een virulentiefactor van *B. cinerea* beschouwd kan worden. Deze is echter niet van essentieel belang voor virulentie op alle andere geteste waardplanten. De *BcatrB* genvervangingsmutanten waren wel enigszins virulenter dan B05.10 op de tomatencultivar Vollendung maar niet op transgene, resveratrol-producerende lijnen van deze cultivar noch op tomatencultivar Moneymaker Cf4. Een verklaring voor dit opmerkelijke cultivarafhankelijke verschil is vooralsnog niet beschikbaar. Tevens werd de rol van ABC transporteurs in de bescherming van *B. cinerea* tegen antibiotica van con-

currende micro-organismen bestudeerd. Fenazine-1-carboxylzuur en fenazine-1-carboxamide, breed-spectrum antibiotica geproduceerd door *Pseudomonas* spp., bleken de expressie van *BcatrB* sterk te induceren en *BcatrB* genvervangingsmutanten waren significant gevoeliger voor deze antibiotica dan de ouderstam. Fenazinen beïnvloedden ook de accumulatie van [¹⁴C]fludioxonil, een fenylpyrrool fungicide dat door *BcatrB* wordt getransporteerd. Deze resultaten tonen aan dat fenazine antibiotica ook door *BcatrB* getransporteerd kunnen worden. De antagonistische activiteit van fenazine producerende *Pseudomonas* stammen was sterker tegen *BcatrB* genvervangingsmutanten dan tegen het *B. cinerea* moederisolaat. Al met al geven deze resultaten aan dat ABC transporteurs van schimmels een belangrijke rol kunnen spelen in antibiotica-afhankelijke interacties tussen bacteriën en schim-

mels in plant gerelateerde ecosystemen, hetgeen aanzienlijke consequenties kan hebben voor biologische bestrijding in land- en tuinbouw.

Conclusie en vooruitblik

Samengevat hebben we gevonden *B. cinerea* ABC en MFS transporteurs bezit, die op verschillende wijzen geïnduceerd worden door fungiciden en natuurlijke fungitoxische verbindingen. *BcatrD* blijkt betrokken te zijn bij bescherming tegen azool fungiciden en *BcatrB* tegen plantenafweerstoffen, fenylpyrrool fungiciden en fenazine antibiotica. We verwachten dat verdere functionele analyse van ABC en MFS transporteurs meer fysiologische functies bij saprofytische groei, pathogenese en multidrug resistentie zal identificeren.

PROMOTIES