

Genetische variatie bij *Botrytis schimmels* in bolgewassen

• TEKST : JAN VAN KAN, MARTIJN STAATS, PETER VAN BAARLEN (WAGENINGEN UNIVERSITEIT, LABORATORIUM VOOR FYTOPATHOLOGIE) EN JOOP VAN DOORN (PPO BLOEMBOLLEN, LISSE)
 • FOTO : WAGENINGEN UNIVERSITEIT

Botrytis is in de teelt van bloembollen een belangrijke ziekteverwekker, die voor grote schade kan zorgen. Daarom is de aanpak voor een afdoende bestrijding van het grootste belang. PPO Bloembollen werkt daarin nauw samen met Wagening Universiteit en Researchcenter (WUR). In de afgelopen vier jaar is bij de Wageningen Universiteit uitgebreid onderzoek gedaan aan Botrytisschimmels in bloembollengewassen. De aandacht ging speciaal uit naar *Botrytis tulipae* en *Botrytis elliptica*.

De schimmelfamilie *Botrytis* bestaat uit 23 soorten die veel gewassen kunnen aantasten. Er zijn waarschijnlijk tien soorten die bolgewassen kunnen infecteren. Van deze schimmelsoorten wordt aangenomen dat ze gespecialiseerd zijn op één bepaalde waardplantsoort. Daarnaast is er de soort *Botrytis cinerea* die meer dan 200 plantensoorten kan infecteren. *Botrytis cinerea* komt in bolgewassen vooral voor op planten die al zijn aangetast door andere ziektes of op planten die verwelken aan het eind van het groeiseizoen. Het onderzoek richtte zich op verschillende fundamenteel-wetenschappelijke aspecten die voor de praktijk belangrijk kunnen zijn.

GENETISCHE VARIATIE TUSSEN SCHIMMELSOORTEN

Voor een goed onderzoek is het van belang te weten of de beschreven *Botrytis*-soorten ook daadwerkelijk verschillende soorten zijn. Deze vraag werd beantwoord door de DNA-volgorde te bepalen van een aantal schimmelgenen in alle 23 *Botrytis*-soorten. Op basis van verschillen in de DNA-volgorde kon worden geconcludeerd dat er inderdaad sprake is van verschillende soorten, misschien met uitzondering van *Botrytis croci* en *Botrytis hyacinthi*, die op de onderzochte DNA-stukken slechts op één positie verschilden! Met de gegevens over DNA-volgorde werd een evolutie-

lutionaire stamboom opgesteld die de verwantschap tussen de *Botrytis*-soorten beschrijft. Daaruit bleek dat de verwantschap tussen de schimmelsoorten geen verband hield met de evolutionaire verwantschap tussen de waardplanten. Zo zijn twee *Botrytis*-soorten (*B. narcissicola* en *B. polyblastis*) die narcis infecteren niet sterk verwant. *Botrytis tulipae* die tulp infecteert en *Botrytis elliptica* die infecteert zijn niet sterk verwant. Ook zijn er vijf *Botrytis*-soorten die in de stamboom erg ver uit elkaar staan, maar alleen uit kunnen infecteren. Anderszijds zijn er *Botrytis*-soorten die aan elkaar verwant zijn, maar waardplanten uit verschillende plantenfamilies infecteren (ui, lelie, boterbloem). Deze resultaten maken duidelijk dat *Botrytisschimmels* tijdens de evolutie meerdere keren een "sprong" hebben gemaakt naar andere waardplanten.

GENETISCHE VARIATIE BINNEN BOTRYTISSOORTEN

Een tweede vraag was hoe groot de genetische variatie binnen een veldpopulatie van één *Botrytis*-soort is. Voor optimale bestrijding is het van belang om te weten of een schimmelpopulatie genetisch uniform is, ofwel grote variatie vertoont. Ook hiervoor werd gebruik gemaakt van DNA-analyses. DNA uit veldisolaten van *Botrytisschimmels*

werd geanalyseerd. Schimmelisolaten zijn op verschillende momenten in Lisse verzameld in het groeiseizoen. Vroeg in het seizoen (tulp-april, lelie-augustus) werden lesies van *Botrytis* op blad ("spetters") verzameld. Later in het seizoen, als de weersomstandigheden gunstig waren voor vuur, en de epidemie op gang kwam, zijn opnieuw schimmels verzameld. In het laboratorium werden deze verdergekweekt. Naast *Botrytis*-soorten werden ook andere schimmels aangetroffen in het blad. Als het om *Botrytis*-infectie ging en de schimmel in reinkweek was gebracht werd DNA uit de schimmel geïsoleerd voor analyse. Over de drie jaren dat in het veld bemonsterd is, zijn er van *Botrytis tulipae* en *Botrytis elliptica* vele honderden isolaten verkregen en onderzocht. De vraag was of binnen één veld in één groeiseizoen alle isolaten hetzelfde patroon zouden vertonen. Dat zou erop duiden dat een epidemie van één schimmelgenotype zou heersen. Dat bleek niet het geval; in *Botrytis tulipae* blijkt een aanzienlijke genetische variatie te zijn. Binnen één veldje werden isolaten met verschillende streepjespatronen gevonden. Er is in het veld geen sprake van een epidemie door één *Botrytis tulipae* genotype. Er zijn verschillende *Botrytis tulipae* genotypes aanwezig die tegelijkertijd en door elkaar heen hetzelfde veldje kunnen

aantasten. Toch werden bepaalde *B. tulipae* genotypes meerdere keren gevonden in één veldje op verschillende tijden in het seizoen. Van *Botrytis elliptica* is bekend dat het een sexueel stadium kan hebben. Deze waarneming voorspelde dat er in *Botrytis elliptica* veel genetische variatie zou kunnen voorkomen. Die verwachting bleek te kloppen: de streepjespatronen toonden

aan dat *Botrytis elliptica* sterker varieerden dan bij *Botrytis tulipae*.

CONCLUSIE

DNA-methodieken zijn onmisbaar in onderzoek, ongeacht of het fundamenteel-wetenschappelijk of praktijk-gericht is. Met DNA-methodieken kun je betrouwbaar, snel en relatief goedkoop uitspraken doen over genetische verschillen

tussen schimmels of planten (cultivars). Inzicht in het DNA van *Botrytis tulipae* en *Botrytis elliptica* moet er in de toekomst aan bijdragen dat epidemieën van vuur kunnen worden voorkomen of effectiever bestreden.

Het onderzoek werd gefinancierd door Technologiestichting STW.

SCHIMMEL IN STREEPJESCODE

In het onderzoek komt de schimmel in beeld met de zogenaamde AFLP-methode waarmee van het DNA een streepjescode wordt gemaakt die voor elk levend organisme anders kan zijn. Aan deze streepjescode kun je zichtbaar maken of twee schimmelisolaten verschillen. Als de streepjespatronen verschillen kunnen we met zekerheid vaststellen dat twee isolaten niet hetzelfde kunnen zijn. Hoe meer de streepjespatronen verschillen, hoe minder verwant de schimmels aan elkaar zijn.



Figuur 1 AFLP analyse van drie *Botrytis*-soorten

Duidelijk is te zien dat alle 10 isolaten die behoren tot de soort *Botrytis tulipae* op elkaar lijken. Dat geldt ook voor de 4 isolaten van *Botrytis cinerea* en de 10 isolaten *Botrytis elliptica*. Binnen één soort komt het merendeel van de streepjes in alle isolaten voor. Er zijn verschillen binnen één soort, maar dat geldt voor minder dan 25% van de streepjes. Tussen de verschillende schimmelsoorten zijn weinig overeenkomsten in streepjespatronen te vinden (minder dan 10% overeenkomsten). Aan de streepjescodes is dus te zien tot welke soort een schimmelisolaat behoort.

SCHIMMELSEX IN HET VELD

Sommige *Botrytis*-soorten hebben een sexueel stadium waarin ze een paddestoeltje (1-5 mm) produceren. Deze paddestoeltjes worden in de bodem en op gewasresten gevormd in het vroege voorjaar. Ze bevatten ascosporen, geslachtelijke sporen die een nieuwe infectie kunnen beginnen. Ascosporen zijn anders dan de ongeslachtelijke sporen (conidia) die in de rest van het jaar kunnen worden gevormd op geïnfecteerd plantmateriaal. Sex leidt tot een hogere genetische variatie. Dit kan consequenties hebben voor eigenschappen van de schimmel. Er kunnen nieuwe types ontstaan, die misschien agressievere infecties kunnen veroorzaken. Ook kan resistentie tegen bestrijdingsmiddelen zich in de populatie verspreiden.



Paddestoeltjes van *Botrytis*

Van *Botrytis tulipae* is in het veld nooit een sexueel stadium beschreven. Van *Botrytis elliptica* is wel beschreven dat het een sexueel stadium heeft en in maart paddestoeltjes kan vormen op restanten van leliestengels die op het veld zijn achtergebleven.