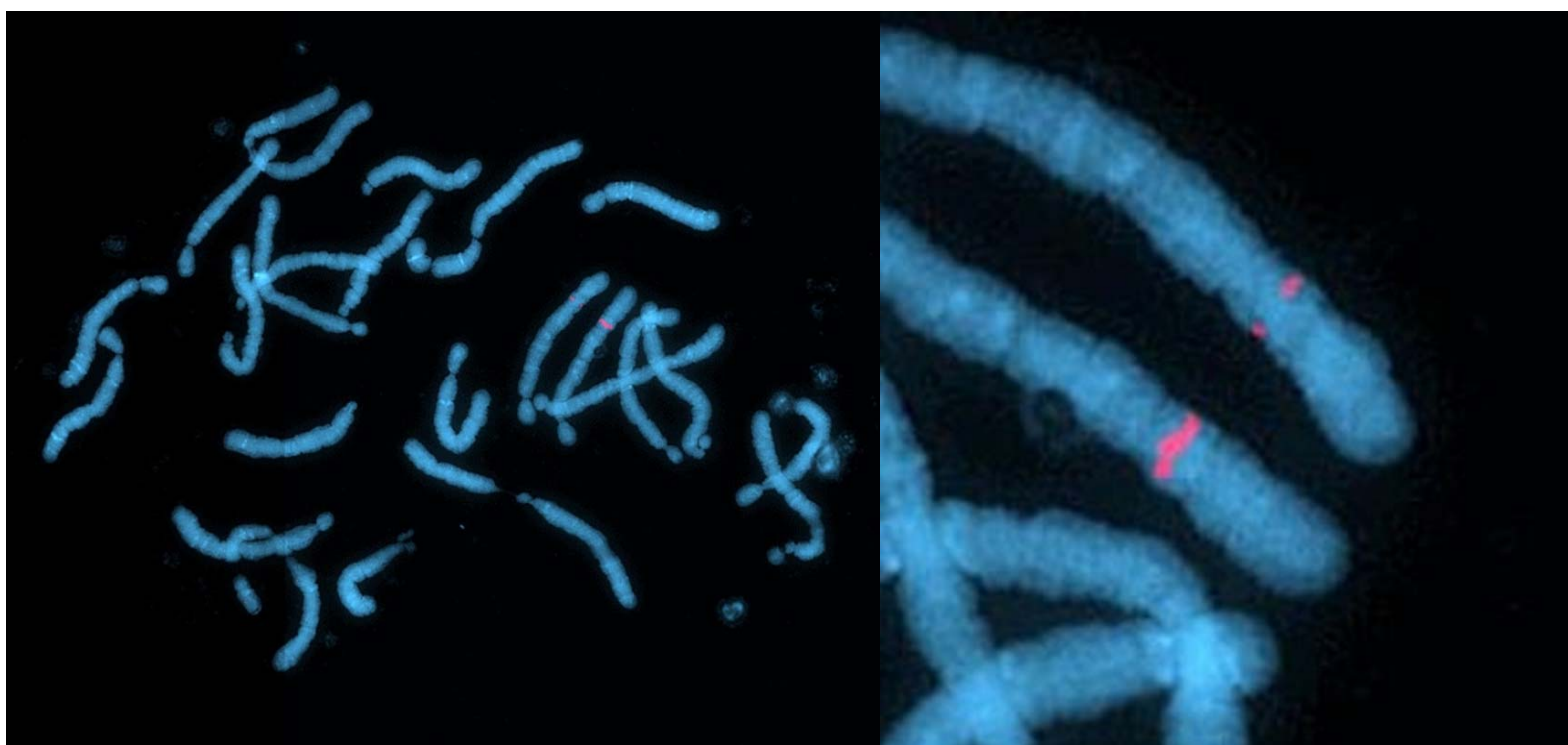




Monocotyle resistentiemechanismen tegen *Botrytis* ten opzichte van dicotylen onderzocht.

Theo Prins



Monocotyle resistentiemechanismen tegen *Botrytis* ten opzichte van dicotylen onderzocht.

Eindverslag ten behoeve van project PT11566.01.

Theo Prins

*Plant Research International B.V.
Droevendaalsesteeg 1
6708 BP Wageningen.*

Gegevens:

Financier: Productschap Tuinbouw

PT projectnummer: 11566.01

PRI projectnummer: 07600019100

Projectleider: Theo Prins (PRI)

Onderzoekperiode: 2003-2004 (1 jaar)

Begeleidingscommissie:

Corine Anker (PT) Voorzitter

Peter Bakker (RUU)

Ysbrand de Jong (StiVerBol)

Jan van Kan (WUR)

Rients Niks (WUR)

Projectmedewerkers:

Linda Kodde

Frans Krens

Theo Prins

Jaap van Tuyl

Inhoudsopgave

Inhoudsopgave.....	3
Voorwoord.....	4
Samenvatting.....	4
Probleemstelling.....	5
Doelstelling.....	6
Onderzoeksomschrijving.....	7
Materiaal en Methoden.....	8
Resultaten.....	10
Discussie.....	19
Conclusies.....	21
Literatuur.....	23

Op de voorpagina:

Chromosoompreparaat van lelie ‘Connecticut King’.

Het preparaat is door middel van Fluorescent In Situ Hybridisation (FISH) gekleurd met het oxalaat oxidase fragment *oxo1*. Dit fragment is 350 bp groot; tot nu toe het kleinst mogelijke fragment om FISH toe te passen.

In dit preparaat is een chromosoompaar te zien dat de *oxo1* sequentie bevat (rose/rood). Eén chromosoom bevat één kopie (een dubbele stip voor het allel in beide chromatiden) terwijl het andere meerdere kopieën bevat.

Met dank aan Rodrigo Barba-Gonzalez MSc en mw. Prof. dr. Ludmilla Khrustaleva.

Voorwoord

Het hier beschreven onderzoek naar “monocotyle resistentiemechanismen tegen *Botrytis* t.o.v. dicotylen onderzocht” werd uitgevoerd in opdracht van de sector Bloembollen van het Productschap Tuinbouw.

Het doel was om fundamentele kennis op het gebied van *Botrytis* resistentie te vergaren waarmee de bloemensector in het algemeen en de bloembollensector in het bijzonder met nieuwe inzichten het *Botrytis* probleem kan bestrijden.

De belangrijkste rol in het veronderstelde resistentiemechanisme speelt het genproduct oxalaat oxidase. Hiervan werd de genetische code en de werking in tulp en lelie bestudeerd. Het oorspronkelijke projectplan van drie jaar had een go no-go moment na één jaar. Door redenen die beschreven worden in dit rapport is besloten om het project na dit eerste jaar niet te continueren.

Samenvatting

Botrytis cinerea (grauwe schimmel of vuur) tast een groot aantal gewassen aan tijdens de groei en/of de naoogst fase. Deze schade betekent dat verkoopcijfers beduidend minder zijn als gevolg van opbrengstdaling of cosmetische schade aan (sier)gewassen.

Het vuuronderzoek dat tot nu toe is uitgevoerd bij tulp (*B. tulipae*) en lelie (*B. elliptica*) heeft zich vooral laten leiden door resultaten van *B. cinerea* aantasting in dicotylen (tweezaadlobbigen, bv. tomaat). Vreemd genoeg is *B. cinerea* niet in staat het merendeel van de monocotyle gewassen (eenzaadlobbigen, bv. tulp en lelie) te infecteren, hoewel *B. cinerea* wel als ‘zwak’ pathogeen (dus na een eerste infectie door een gewasspecifiek pathogeen) in staat is een bepaalde plant te gebruiken als groeimedium.

Er zijn verschillende feiten die er op wijzen dat het enzym oxalaat oxidase een resistentiefactor kan zijn tegen *B. cinerea*. Oxalaat oxidase is een enzym dat oxaalzuur kan inactiveren en omzetten naar waterstofperoxide (H_2O_2) en CO_2 :

- ↓ *B. cinerea* produceert redelijk veel oxaalzuur.
- ↓ *B. cinerea* kan niet of nauwelijks monocotylen infecteren.
- ↓ Veel, zo niet alle monocotylen hebben het enzym oxalaat oxidase. Dicotylen daarentegen niet.
- ↓ De schimmel *Sclerotinia sclerotiorum* (een ‘broertje’ van *Botrytis*) kan normaal een tomaat ziek maken. Als deze tomaat het enzym oxalaat oxidase ontvangt door moleculaire technieken, is de tomaat resistent tegen *Sclerotinia*.

Deze uitgangspunten werden als basis genomen om de resistentie voor *B. cinerea* in tulp en lelie te onderzoeken. Als we immers weten hoe lelie en tulp *B. cinerea* tegen kunnen houden, kunnen we hier ook informatie uit halen hoe we ze moeten beschermen tegen vuur in tulp (*B. tulipae*) en vuur in lelie (*B. elliptica*).

De resultaten van het onderzoek zijn tweeledig (fysiologisch en op DNA niveau). Eerst is van de verschillende vuurveroorzakers (*B. cinerea*, *B. elliptica* en *B. tulipae*) het uitgescheiden oxaalzuur bekeken. Allen hebben een sterke oxaalzuuruitscheiding welke gekoppeld is aan de groei van de schimmel. Vervolgens is in blad van verschillende lelie- en tulpen cultivars een activiteit van het enzym oxalaat oxidase aangetoond. Dit komt overeen met positieve controles van de monocotylen tarwe en gras. Een aantal dicotyle gewassen bleven negatief. Vervolgens is op DNA niveau gekeken naar de erfelijke eigenschap van oxalaat oxidase. Uit dit onderzoek hebben we twee DNA fragmenten in lelie gevonden welke vertaald kunnen

worden tot een oxalaat oxidase. Bij nader onderzoek of één van deze DNA fragmenten wellicht betrokken is bij de infectie, moesten we vaststellen dat dit niet het geval was. Hierdoor heeft het Productschap Tuinbouw besloten het onderzoek niet voort te zetten. Achteraf lijkt het aannemelijk dat er meerdere DNA fragmenten aanwezig zijn welke ook vertaald kunnen worden tot een oxalaat oxidase, maar hier kan helaas geen onderzoek meer gedaan worden binnen dit project.

De conclusies zijn:

- ↓ *Botrytis* maakt zelf oxaalzuur en waterstof peroxide
- ↓ Tulp en lelie hebben een enzym dat oxaalzuur om kan zetten in o.a. waterstof peroxide
- ↓ Een van de twee genen voor dit oxaalzuur-afbrekend enzym dat we van lelie hebben onderzocht, is niet actief tijdens een *Botrytis* infectie

Probleemstelling

Het *Botrytis* onderzoek tot nu toe heeft zich vooral laten leiden door resultaten bij *B. cinerea* aantasting in dicotylen. Vreemd genoeg is *B. cinerea* niet in staat het merendeel van de monocotyle gewassen te infecteren, hoewel *B. cinerea* wel als secundair pathogeen (dus na een primaire infectie door een gewasspecifiek pathogeen) in staat is een bepaalde plant te gebruiken als substraat. Voor deze gewassen is het geslacht *Botrytis* aangewezen op andere soorten zoals *B. elliptica* (lelie), *B. squamosa* en *B. aclada* (ui), *B. tulipae* (tulp), *Botryotinia draytonii* (gladiool) en *B. convoluta* (iris). Bij de term waardplant denken we aan de mogelijkheid voor een schimmel om de plant te gebruiken als substraat voor groei en sporulatie, ondanks dat er binnen die plantenfamilie een mogelijk verschil in resistentieniveau aanwezig is. Een non-host daarentegen is absoluut niet te infecteren door de schimmel en kan derhalve ook niet gebruikt worden als substraat. Dit fenomeen bestaat onder andere ook bij *Verticillium*, waarbij dicotylen als waardplant kunnen dienen terwijl monocotylen voornamelijk non-host zijn.

Nu blijkt uit de literatuur en eigen onderzoek dat *Botrytis cinerea* een hoge uitscheiding van oxaalzuur heeft tijdens de infectie (Prins *et al.*, 2000). Tevens bevatten graangewassen zoals gerst, en mogelijk alle monocotyle gewassen, een enzym (oxalaat oxidase) dat oxaalzuur kan afbreken. Dit is zeer recent bevestigd door Liu *et al.* (2004) waarin oxalaat oxidase als een van de resistentiegenen in rijst, gerst en maïs werd beschreven. Een van de afbraakproducten van oxaalzuur is waterstofperoxide, welke in de plant als signaalmolecuul kan dienen of ter mobilisatie van de afweerreactie direct op het pathogeen kan aangrijpen. Deze combinatie van factoren zou kunnen verklaren dat *B. cinerea* niet in staat is om een groot aantal monocotylen te infecteren omdat deze communicatie over en weer tussen monocotyl en pathogeen anders verloopt dan bij dicotylen. Eerdere experimenten waarbij lelieblad een dag voor *Botrytis*-inoculatie werd behandeld met oxaalzuur resulteerde in een verminderde aantasting van *B. elliptica*. Dit is een indicatie dat oxaalzuur een rol speelt in de plant-pathogeen interactie. Onderzoek naar de rol van mangaan (de cofactor van oxalaat oxidase) bij tulp (PPO) heeft ook een positief effect op de groei en fysiologie aangetoond.

Voor de plant is oxaalzuur/oxalaat oxidase van essentieel belang voor de volgende processen:

- ↓ mobilisatie van Ca^{2+}
- ↓ antivraat tegen insecten door Ca-oxalaat kristallen
- ↓ Signaalfunctie door H_2O_2 ?

Voor de schimmel zijn dit:

- ↓ Maceratie van celwanden
- ↓ Creëren van pH optimum voor eigen pectolytische enzymen ter bevordering van celwandafbraak
- ↓ Onttrekking van Ca^{2+} door vorming van Ca-oxalaat
- ↓ Productie van H_2O_2 vanuit oxaalzuur?

Een andere invalshoek die een rol voor oxaalzuur suggereert kan gevonden worden bij de in de literatuur beschreven geïnduceerde systemische resistentie (ISR) door bijvoorbeeld *Pseudomonas putida* en *Bacillus subtilis*. Applicatie van deze bacteriën, voorafgaand aan een *B. cinerea* inoculatie, zou de *Botrytis* aantasting significant reduceren. *P. putida* en *B. subtilis* produceren echter ook een oxalaat oxidase welke het oxaalzuur van *B. cinerea* zou kunnen herkennen en vervolgens omzet in het signaalmolecuul H_2O_2 .

In Zwitserland onderzoekt het laboratorium van Métraux

(<http://www.unifr.ch/plantbio/new/jpm/ox.html>) de inzet van deze bacteriën om *Botrytis* aantasting te voorkomen door ze als 'biopantser' aan te brengen. De oxaalzuurafbrekende enzymen (oxalaat oxidase) verwijderen het door *Botrytis* geproduceerde oxaalzuur waardoor de plant minder aangetast wordt. Hieraan is echter in dit onderzoek geen aandacht aan besteed.

In dit onderzoek wilden we de hypothese toetsen dat de waardspecificiteit en de infectiestrategie van *Botrytis* ssp. verschilt tussen monocotylen en dicotylen. Als basis voor deze hypothese werd de rol van het bovengenoemde oxaalzuur bestudeerd. De uitkomst van dit onderzoek kan grote consequenties hebben voor vervolgonderzoek aan en bestrijding van *Botrytis* in monocotyle gewassen. Een beter inzicht in de interactie tussen *Botrytis* en monocotylen zal namelijk een doelgerichte bestrijding mogelijk kunnen maken welke direct ingrijpt op de oxaalzuurcommunicatie. In het licht van geïnduceerde resistentie zou b.v. applicatie van oxaalzuur of de co-factor van oxalaat oxidase (mangaan) bij de monocotyle gewassen een reactie opwekken die de aanwezigheid van *Botrytis* simuleert. Hierdoor wordt oxalaat oxidase c.q. H_2O_2 geactiveerd hetgeen een signaalmolecuul is voor de aanschakeling van pathogenese-gerelateerde genen. Als er daadwerkelijk een pathogeen in het gewas komt zal de plant voorbereid zijn op deze infectie (door 'tweaking') en een betere respons paraat hebben.

Omdat *B. tulipae* in staat is om vatbare tulpen te infecteren en *B. elliptica* in staat is om vatbare lelies te infecteren, is oxaalzuur/oxalaat oxidase niet de enige verklarende factor voor resistentie. Dit onderzoek is primair gericht op de eigenschap van monocotylen om *B. cinerea* buiten te houden. Met deze kennis kan vervolgens naar een oplossing gezocht worden voor *B. tulipae* en *B. elliptica*.

Gezien de breedte van het onderzoek kunnen naast de sector bolbloemen en bloembollen ook andere sectoren profiteren van het hier beschreven onderzoek omdat het probleem van *Botrytis* en *Botrytis* bestrijding een sectoroverschrijdend probleem is.

Doelstelling

De doelstellingen welke in dit onderzoek werden beoogd zijn tweeledig. Gezien het fundamentele karakter van het onderzoek wilden we in eerste instantie inzicht verkrijgen in de rol van oxalaat oxidase bij de resistentie tegen *Botrytis* spp. De tweede, maar niet minder belangrijke doelstelling was het implementeren van de resultaten tot een strategie waarbij tulp

en lelie effectief tegen vuur kunnen worden beschermd. Dit kan kortweg met de volgende criteria worden beschreven:

- De hoeveelheid bepalen van de eventueel aanwezige oxaalzuurproductie, dan wel andere zuren, van *Botrytis cinerea*, *B. tulipae* en *B. elliptica*.
- Het aantonen en karakteriseren van eventuele oxalaat oxidase genen (OXO) in de monocotyle gewassen tulp en lelie en de eventuele co-factoren die hierbij een rol spelen.
- Het onderzoeken van de mogelijkheid om een resistentie te bewerkstelligen in monocotylen door behandeling met het *Botrytis*-specifieke (oxaal)zuur of de co-factoren hiervan. Ondanks dat het *Botrytis*-probleem ketenbreed is zal eerst een start gemaakt worden op plantniveau. Bruikbare onderzoeksresultaten zouden kunnen leiden tot bestrijding van de naogst problematiek.

Onderzoeksomschrijving

Zowel tulpen- als leliecultivars vertonen verschillen in vuurresistentie en er is in de afgelopen jaren reeds uitvoerig onderzoek gedaan naar deze resistentieniveaus. Zowel vanuit de plant als vanuit de schimmel zal worden gekeken of oxalaat oxidase een rol speelt bij het verschil in resistentieniveaus. Aan de plantkant zal worden gekeken naar de activiteit van oxalaat oxidase en het hiervoor verantwoordelijke gen. Aan de schimmelkant zal de oxaalzuurproductie worden onderzocht.

Fysiologisch:

Lelies en tulpen hebben verschillen in resistentie tegen de soorteigen *Botrytis* ssp. Voor de activiteit van het oxalaat oxidase zal op (relatief) resistente en vatbare cultivars een assay uitgevoerd worden waarmee de activiteit van oxalaat oxidase kan worden gevisualiseerd. Door deze opzet kunnen we een uitspraak doen over de relatie tussen oxalaat oxidase activiteit en resistentie tegen *Botrytis*.

Aan de schimmelkant kijken we naar de kwantitatieve (oxaal)zuurproductie. Er zal worden onderzocht of er een relatie bestaat tussen (oxaal)zuuruitscheiding en de waardrelatie van de desbetreffende *Botrytis* ssp.

Tenslotte wordt er een inoculatie-experiment uitgevoerd waarbij H₂O₂ en oxaalzuur in een aangeprikt blad worden onderzocht op de infectiegraad.

Moleculair:

Voor het kloneren van het gen voor oxalaat oxidase zal een onderzoek worden gedaan naar de verschillende oxalaat oxidase genen in de sequentiedatabank. Door naar de sequentie van 'echte' oxalaat oxidase genen te kijken, kunnen gedegeneerde primers op geconserveerde gebieden worden ontwikkeld en deze primers geven voor PCR op tulp en lelie een verhoogde kans op het isoleren van de goede oxalaat oxidase. Slechts sommige van de oxo genen van monocotylen hebben een enzymactiviteit waarbij oxaalzuur wordt omgezet tot H₂O₂. Andere genen welke hierop lijken maar deze activiteit niet bezitten worden Germins of GLP's (Germin-Like Proteins) genoemd.

Er zal eerst een PCR met gedegeneerde primers op een tulp en een lelie worden uitgevoerd. Na sequentie-informatie kunnen we door genome walking naar buiten lezen totdat het hele gen is gekloneerd. Op basis van deze sequentie kunnen vervolgens 5' en 3' flankerende (en unieke) primers worden ontworpen waarmee resistente en vatbare tulpen en lilies gekarakteriseerd zullen worden.

Materiaal en Methoden

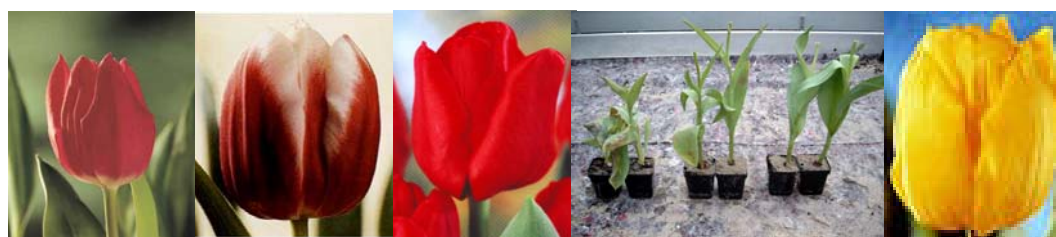
Botrytis opkweek

Voor het vermenigvuldigen van *Botrytis* werd gebruik gemaakt van een standaard Malt Broth Agar (MA). Hier werd soms ook een fijngemalen hoeveelheid lelieblad (~150 g/l) aan toegevoegd om *Botrytis tulipae* en *B. elliptica* een extra groeistimulans te geven. De kweek werd onder constant UV-licht gehouden bij 18 °C. Voor *B. elliptica* werd ook bijgelicht met wit licht. Na ~2 weken groei waren de platen klaar voor gebruik. Er werd enkele malen overgezet van de oude planten af, maar om de 2 maanden werden nieuwe glycerolstocks gebruikt voor de aanenting. De isolaten zijn labstocks welke aanwezig zijn op PRI en afkomstig waren van PPO-Lisse. *Botrytis cinerea* referentie-isolaat B05.10 is een gift van Prof. dr. P. Tudzynski uit Duitsland (Quidde *et al.*, 1999).

Bij het oogsten van *Botrytis* conidia van de plaat werden met 5 ml water en 0.05 % Tween-80 de conidia afgekrabd m.b.v. een Drigalski spatel. Het hydrofobe karakter van de conidia vereist hierbij de oppervlaktespanningverlager Tween-80. Vervolgens werd de suspensie over een kaasdoek gehaald om een zuivere conidiasuspensie over te houden. De concentratie van sporen in deze suspensie werd bepaald en daarna doorverdund tot $2 \cdot 10^5$ conidia·ml⁻¹. Dit kwam overeen met 200 conidia per µl. In tegenstelling tot *B. cinerea* was geen toevoeging van sucrose of fosfaat nodig voor een succesvolle infectie. Ook kan de incubatie op kamertemperatuur van twee uur achterwege worden gelaten. Inoculatie werd meteen aansluitend aan de isolatie uitgevoerd.

Plantmateriaal

Als uitgangsmateriaal werden de tulpencultivars Christmas Marvel, Leen van der Mark, Ile de France en Monte Carlo gebruikt (zie Figuur 1). Van lelie werden onder andere de cultivars Connecticut King, Mont Blanc, Amarone en Sorbonne gebruikt (zie Figuur 2). De planten werden onder standaardcondities opgekweekt zoals die op PRI gebruikelijk zijn. De experimenten met tulp werden in de periode van eind januari tot begin mei uitgevoerd. De lelie-experimenten werden tussen juni en september uitgevoerd. Bij de experimenten werd voor een groeisynchronisatie gekozen waarbij de experimenten zijn uitgevoerd vlak voor de bloeiperiode van de gewassen.



Figuur 1: v.l.n.r. de tulpencultivars Christmas Marvel (vatbaar), Leen van der Mark (matig resistent) Ile de France (resistent). Rechts zijn de aangetaste tulpen te zien (5 d.p.i.) en Monte Carlo.



Figuur 2: v.l.n.r. de leliecultivars Amarone, Connecticut King en Sorbonne.

Plaatassay voor zuurproductie

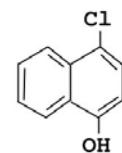
Een standaardplaat met PDA- of MA-agar werd gegoten met een fractie Broomkresolgroen als pH-indicator. Deze indicator geeft een omslagpunt van geel (<3.6) tot blauw (>5.4). Conidia (2 μ l van een $2 \cdot 10^5$ conidia- ml^{-1} suspensie) van *B. elliptica*, *B. tulipae* en *B. cinerea* werden in het midden van de plaat gebracht en onder standaardcondities weggezet. Na 3 dagen werd de plaat bekeken op verkleuring van het medium. Naast conidia is ook gebruik gemaakt van myceliumplugjes van gelijke afmeting.

Voor het vaststellen aanwezigheid en hoeveelheid van het zuur werd gebruik gemaakt van het principe dat calcium-ionen neerslaan met oxalaat tot het onoplosbare calcium oxalaat. Door CaCl_2 toe te voegen aan het medium, zal bij oxaalzuurproductie een melkachtige halo ontstaan.

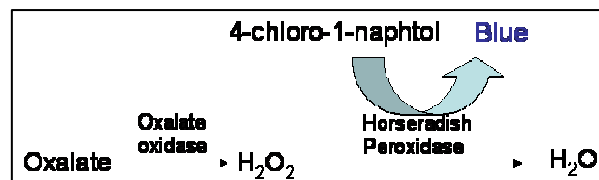
Om de concentratie oxaalzuur te schatten is een plaat zoals boven beschreven met verschillende concentraties oxaalzuur bedruppelt. Dit gebeurde met 2 μ l oxaalzuur van de concentraties 0.1, 1, 10 en 100 mM oxaalzuur. Door deze opzet kan een kleuromslag gekoppeld worden aan een oxaalzuurconcentratie.

Oxalaat oxidase activiteit

De activiteit van oxalaat oxidase werd in plantenweefsel zichtbaar gemaakt door te incuberen in een succinaat buffer (25 mM succinezuur; 3,5 mM EDTA pH = 4) (Dumas *et al.*, 1995). Deze buffer bevat 2,5 mM oxaalzuur, 1 U- ml^{-1} horseradish peroxidase (HRP) en de elektronendonor 4-chloro-1-naphtol (0,6 mg- ml^{-1} , zie inzet rechts). Volgens onderstaande reactie is te zien dat er een blauwe kleur ontstaat bij oxalaat oxidase activiteit.



4-chloro-1-naphtol



Deze blauwe kleur is met het oog waar te nemen in weefsel waar oxalaat oxidase actief is.

Moleculaire analyse

Voor het kloneren van oxalaat oxidase uit tulp en lelie werd gebruikt gemaakt van ~ 300 eiwitsequenties met (veronderstelde) oxalaat oxidase signatuur [EC1.2.3.4]. Met dit alignment werd een similariteits-dendrogram gemaakt waarmee inzicht werd verkregen in de klustering tussen monocotyle en dicotyle oxo-achtige sequenties. Op basis van de monocotyle klustering met *Hordeum vulgare* (o.a. GI 1171936, 2266668, 14278247, 539054, 1171937 en

516871) en *Tritium aestivum* (o.a. GI 7447344, **289357**, 100782, 121129, 170694, 744734, 3100836, **121131**, 7447342, 1772597), waarbij sequenties met bewezen oxalaat oxidase activiteit vet zijn weergegeven, werd een selectie gemaakt voor de bepaling van de consensus.

De consensus aminozuursequentie werd vervolgens omgezet in gedegenereerde forward primers:

CARgAYTTYTgYgTggCIgA en ATgCAYCARTTYAAggT en reverse primers: RACRTTRAAYTgRTgCAT en RAAICCGCCIGCRAAYTT. Met verschillende primercombinaties werd volgens standaardcondities de PCR uitgevoerd. Als template werd DNA van lelie 'Sorbonne' (R), 'Connecticut King' (v), 'Kees Nelis' (v) en *Tulipa tarda* (R) gebruikt.

Geamplificeerde banden werden vervolgens gekloneerd in pGEMT-Easy[®] en de basenvolgorde werd bepaald door Greenomics.

Sequentieanalyse werd uitgevoerd met DNASTar (EditSeq, MapDraw en Megalign) en NCBI (Blastx en Fasta).

'Genome walking' werd uitgevoerd om flankerende sequenties van het genfragment op te sporen. Dit is een techniek waarbij het genoom in stukken wordt geknipt met een restrictie-enzym (met de restrictie-enzymen *PvuII* of *DraI*). Vervolgens worden er adapters op de restrictiesites gezet. Met behulp van primers op de adapters en een nieuw-ontwikkelde primer in de oxo-sequentie kan vervolgens naar buiten in de 5' en de 3' flankerende gebieden gelezen worden. Een eerste PCR met interne primer en adapter primer werd gevolgd door een nested PCR.

Inoculatie-experiment

Blad van de vier tulpencultivars werd aangeprikt met een naald en hier zijn een reeks concentraties van H₂O₂ en oxaalzuur op aangebracht. Vervolgens is met *B. cinerea*, *B. tulipae* en *B. elliptica* volgens de standaard methode (2 µl van een 2·10⁵ conidia/ml) geïnoculeerd en geïncubeerd.

Northern blot

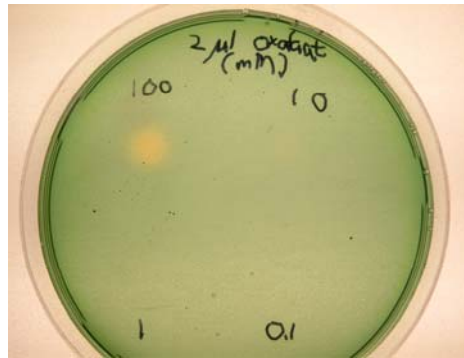
Op resistente en vatbare tulp en lelie werd een inoculatie experiment uitgevoerd. De inoculaties zijn met *B. elliptica*, *B. tulipae* en *B. cinerea* uitgevoerd op alle planten. Na 1 dag en na 3 dagen werd bladmateriaal geoogst. Ook werd er een incubatie gedaan met lelieblad in een oplossing van water, 1, 50 en 100 µM H₂O₂, 100 mM NaCl en 50 µM Jasmonzuur zoals beschreven door Le Deunff *et al.* (2004). Op t = 0 uur en t = 7 uur werden bladsamples genomen. Hiervan werd totaal RNA geïsoleerd en een RNA gel gemaakt (glyoxal/DMSO) welke vervolgens werd geblot (Sambrook *et al.*, 1989). Als radioactieve probe werd oxo1 gebruikt. Een ribosomaal liefragment van 600 bp was aanwezig om de blot te kwantificeren voor de lading van RNA.

Resultaten

Plaatassay voor zuurproductie

Om een idee te krijgen van de hoeveelheid oxaalzuur die nodig is om een verkleuring in de testplaten te bewerkstelligen, werd een reeks van oxaalzuurconcentraties op een plaat gedruppeld. Het gaat hierbij om 2 µl van een 0,1 – 1 – 10 – 100 mM concentratie (zie Figuur 1).

Uit Figuur 1 blijkt dat slechts bij 2 µl 100 mM oxaalzuur een verkleuring van het medium ontstaat.



Figuur 1: Oxaalzuurconcentratie welke nodig was voor verkleuring van pH-indicatorplaat.

Bij het aanenten van de pH-indicatorplaat met de verschillende conidia van *Botrytis* is rekening gehouden met een gelijke concentratie of een gelijke grootte van de agarplug. In figuur 2 is de ontwikkeling van de gele (zure) halo, vooruitlopend op de myceliumontwikkeling te zien.



Figuur 2: Radiale myceliumontwikkeling van agarplugs *Botrytis* op een pH-indicatorplaat na 5 dagen. Vlnr: *B. elliptica*, *B. tulipae* en drie isolaten van *B. cinerea* (met in het midden het referentie-isolaat B05.10).

Uit dit experiment en experimenten met conidia bleek dat *B. cinerea* de snelste radiale groei heeft, gevolgd door *B. tulipae*. *B. elliptica* was de langzaamste groeier. De geelverkleuring van het medium, een graad voor de pH, liep bij alle platen vooruit op de myceliumontwikkeling. Het zuur dat de pH verandering teweeg bracht moest oxaalzuur zijn omdat in platen met het oplosbare CaCl_2 een melkachtig calciumoxalaat neersloeg.

Oxalaat oxidase activiteit

De oxalaat oxidase activiteit (H_2O_2 productie) werd in juveniele wortels bestudeerd. Bij wortels van de monocotylen tulp, lelie, tarwe en gras werd een verkleuring waargenomen na 15 minuten incubatie in de beschreven buffer. De dicotyle controleplantjes muur en vroegeling gaven geen verkleuring van de wortels (zie Figuur 3).



Figuur 3: Oxalaat oxidase activiteit bij juveniele wortels. Vlnr tulp, lelie, tarwe, vroegeling en muur. Inzet: gras.

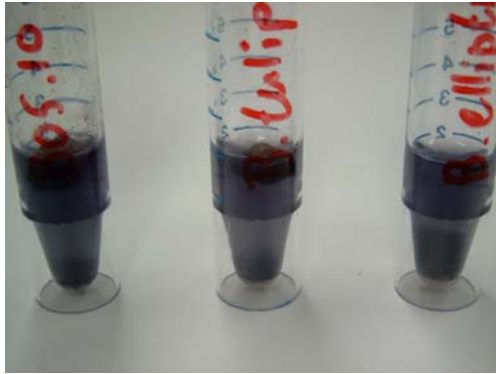
Voor het bestuderen van de H_2O_2 excretie van *Botrytis* werd gekeken naar agarplugs van gelijke afmeting van *Botrytis* platen. Incubatie in de buffer gaf na drie uur (Figuur 4) overduidelijk aan dat alleen *B. cinerea* in staat is om op korte termijn een hoge productie/excretie teweeg te brengen. Na drie dagen bleek de blauwkleuring over alle buizen gelijk (Figuur 5). Dit experiment werd niet opgezet als tijdanalyse, maar laat wel de opgebouwde hoeveelheid H_2O_2 zien.



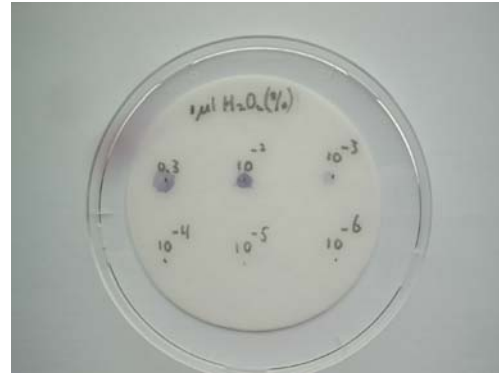
Figuur 4: H_2O_2 productie/secretie na drie uur van agarplugs met *Botrytis*. Vlnr *B. cinerea* B05.10, *B. elliptica* en *B. tulipae*.

Om een indruk te krijgen van de hoeveelheid H_2O_2 die nodig is om een verkleuring teweeg te brengen werd een filterpapier gedrenkt in buffer. Vervolgens werd hier een concentratiereeks H_2O_2 opgebracht (1 μ l van 0,3% - $1 \cdot 10^{-6}$ %, Zie Fig. 6).

Uit deze ruwe schatting bleek dat een concentratie van meer dan 0,03% H_2O_2 nodig was voor een paars/blauwkleuring.



Figuur 5: H_2O_2 productie na 3 dagen. Voor volgorde, zie Figuur 4.



Figuur 6: Concentratiereeks met H_2O_2 .

Inoculatie-experiment

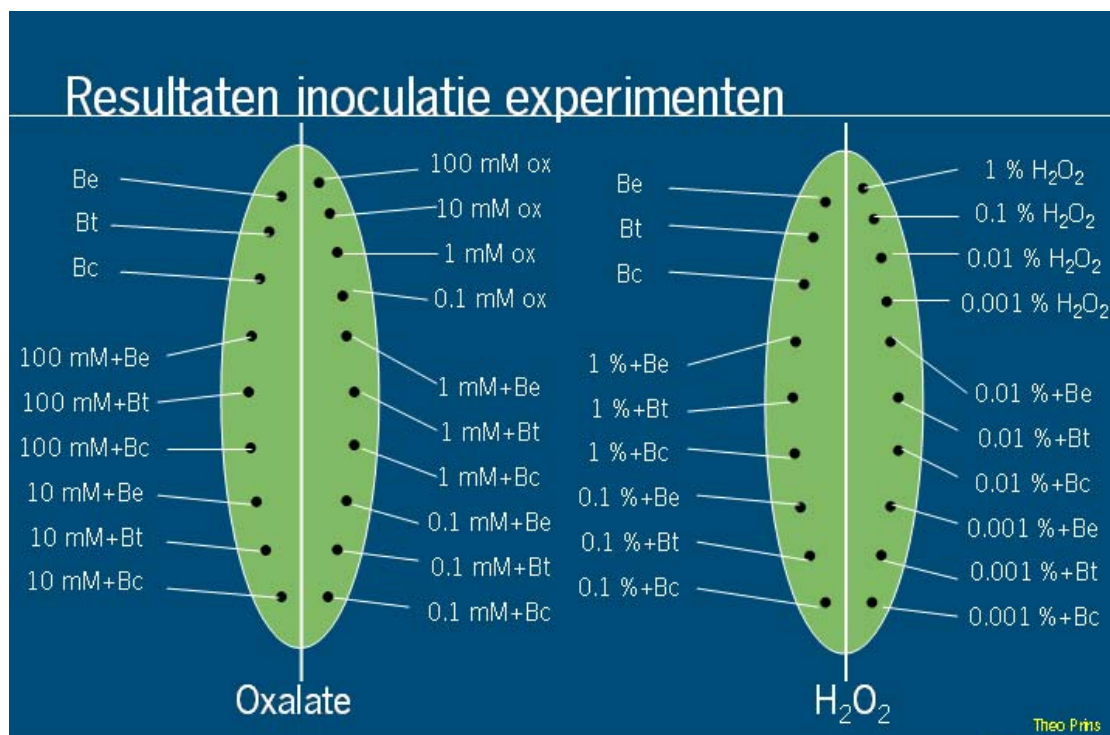
In een inoculatie-experiment met tulp werd gekeken naar het effect van H_2O_2 en oxaalzuur voorafgaand aan een inoculatie. Hiertoe werd een tulpenblad aangeprikt en werd er 2 μ l van een 1% H_2O_2 oplossing en 1 μ l van een 100 mM oxaalzuur oplossing aangebracht (Figuur 7).



Figuur 7: Effect van 1% H_2O_2 (l) of 100 mM oxaalzuur (r) op aangeprikt tulpenblad na 30'.

Verskillende concentraties werden getest bij verschillende tulpen cultivars. Alleen de hoogst geteste concentratie 100 mM oxaalzuur was in staat om binnen 30' na aanbrengen een necrotische lesie te induceren op alle cultivars.

De resultaten geven weer dat *B. tulipae* uiteraard goed in staat is om tulp te infecteren (zie volgende pagina Figuur 8 voor opbrengschema en Figuur 9 a-d voor de resultaten). Verder is cv. Monte Carlo het meest resistent tegen *B. tulipae*, en ook tegen de andere *Botrytis* ssp. Oxaalzuur in de concentratie 100 mM gaf een necrotische lesie bij alle cultivars. De toevoeging van verschillende concentraties H_2O_2 of oxaalzuur lijkt geen invloed te hebben op de snelheid van de infectie.



Figuur 8: Opbrengschema van *B. elliptica*, *B. tulipae* en *B. cinerea* controles, oxaalzuurcontroles, H₂O₂ controles en de combinaties hiervan. Oxaalzuur en H₂O₂ werden 15' voor *Botrytis* opgebracht.

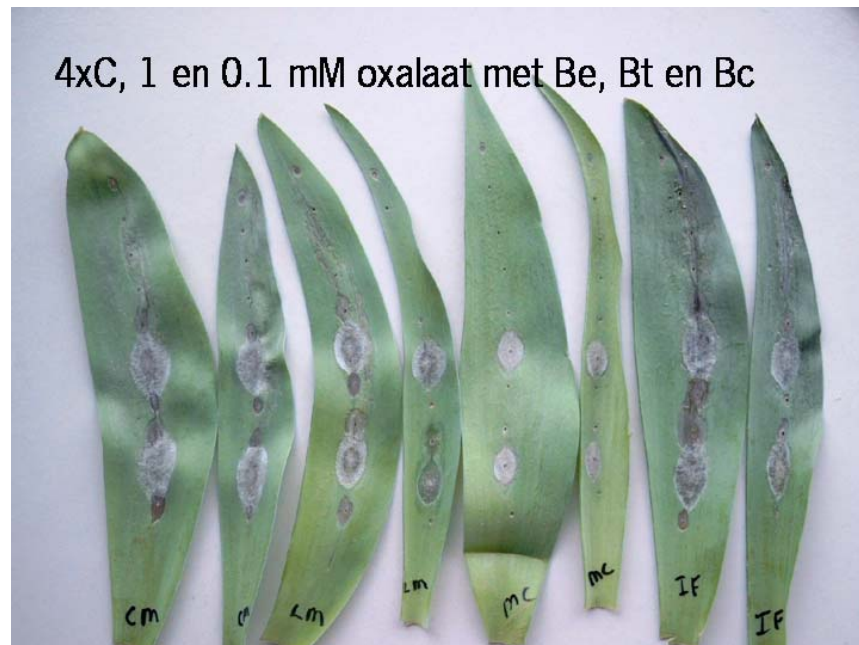
Op de volgende pagina:

Figuur 9 a-d: Effect van toevoeging van verschillende concentraties H₂O₂ en oxaalzuur op de infectie van *Botrytis*. De tulpencultivars Christmas Marvel, Leen van der Mark, Monte Carlo en Ile de France werden gebruikt. Zie Figuur 8 voor opbrengschema. De foto's links laten de linkerhelft van het blad zien. De foto's rechts laten de rechterhelft van het blad zien. Zie tabel I voor de geschatte ziekte-index.

3xC, 100 en 10 mM oxalaat met Be, Bt en Bc



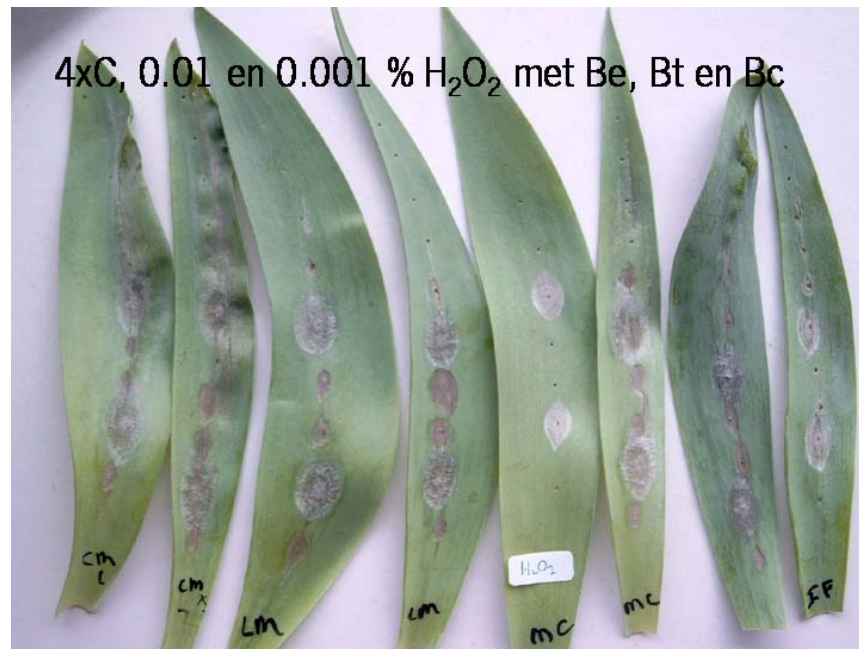
4xC, 1 en 0.1 mM oxalaat met Be, Bt en Bc



3xC, 1 en 0.1 % H₂O₂ met Be, Bt en Bc



4xC, 0.01 en 0.001 % H₂O₂ met Be, Bt en Bc



	Christmas Marvel				Leen v/d Mark				Monte Carlo				Ile de France			
	C	Be	Bt	Bc	C	Be	Bt	Bc	C	Be	Bt	Bc	C	Be	Bt	Bc
Schimmelcontrole		1	5	1		1	5	0		0	4	0		2	5	2
100 mM oxaalzuur	1	2	4	2	1	2	3	3	1	2	3	2	1	3	4	3
10 mM oxaalzuur	0	3	5	3	0	2	5	1	0	0	4	0	0	3	5	0
1 mM oxaalzuur	0	2	5	2	0	2	4	2	0	0	4	0	0	3	5	3
0,1 mM oxaalzuur	0	2	5	2	0	2	4	2	0	0	4	0	0	4	5	2
1 % H ₂ O ₂	0	2	5	2	0	2	4	2	0	1	3	2	0	2	5	2
0,1 % H ₂ O ₂	0	2	4	2	0	2	4	2	0	1	3	2	0	2	5	2
0,01 % H ₂ O ₂	0	1	4	2	0	1	5	3	0	1	4	1	0	2	3	2
0,001 % H ₂ O ₂	0	2	5	2	0	2	5	2	0	1	4	1	0	2	4	1

Tabel I: Bladaantasting door verschillende concentraties oxaalzuur en H₂O₂ (C), schimmelcontroles *B. elliptica* (Be), *B. tulipae* (Bt) en *B. cinerea* (Bc) en combinaties van oxaalzuur-*Botrytis* en H₂O₂-*Botrytis*. Bladaantasting volgens Disease Severity Index 0-5.

Moleculaire analyse

Het similariteits-dendrogram (niet weergegeven i.v.m. de grootte) met de veronderstelde oxalaat oxidase eiwitsequenties geeft aan dat er een bepaalde clustering optreedt tussen sequenties van monocotylen enerzijds en van dicotylen afkomstige sequenties anderzijds. In de vertakking waar zich *H. vulgare* en *T. aestivum* oxalaat oxidases bevonden, komen ook *Lolium perenne*, *Oryza sativa* en *Zea mays* voor, maar geen dicotyle sequenties.

Op basis van de consensus sequentie werden twee forward gedegenereerde primers en twee reverse gedegenereerde primers ontworpen waarmee een PCR reactie werd uitgevoerd op genomisch DNA van tulp (“Kees Nelis”) en lelie (“Connecticut King”).

Na alle mogelijke combinaties van primers en optimalisatie van PCR condities te hebben uitgetoet, was het resultaat twee banden bij lelie. Kloneren naar pGEM-T Easy en sequensen van de banden gaf het volgende resultaat:

Naam	Grootte (nt)	5' missing	3' missing	opmerkingen
Oxo 1	363	36 AA	64 AA	Bevat oxo consensus HPRATEI
Oxo 2	213	36 AA	114 AA	Leest net niet over consensus

De oxo-fragmenten oxo1 en oxo2 gaven een significante homologie met oxalaat oxidases na een Blastx. De hoogste homologieën was met oxo's van monocotylen en minder homologie met die van dicotylen.

Hoogste homologie van oxo1 (HPRATEI box is grijs weergegeven):

```
>gi|50941847|ref|XP_480451.1| putative germin A [O. sativa Japonica-group]
gi|40253832|dbj|BAD05768.1| putative germin A [O. sativa Japonica-group]
```

```
Score = 161 bits (408), Expect = 4e-39
Identities = 80/118 (67%), Positives = 96/118 (81%), Gaps = 1/118 (0%)
Frame = +2, Length = 221
```

```
Query: 8 VSVNGFVCKDPKQAQAGDFFFFPG-LNQPGNSSNQLGSSVTLVSAANLPLGLNTLGLISVARL 184
V VNGFVCK+P A A DFF L++P +++N++GS+VTLV+ LPGLNTLGLIS+ARL
Sbjct: 42 VRVNGFVCKNPMNASADDFFKAAMLDKPRDTNKNVGSNVTLVNVLQLPLGLNTLGLISIARL 101
```

```
Query: 185 EFAPYGLIPPHYHPRATEILTLLEGTLYVGFVTSPPDFRLISKILKAGDVFVFPNALI 358
+FAFAP GL PPH HPRATEI T+LEGTLYVGFVTS+PD RL+SK+L GDVFVFP LI
Sbjct: 102 DFAPLGLNPPHHPHPRATEIFTVLEGTLYVGFVTSNPDNRLLSKVLNKGDFVFPPEGLI 159
```

Hoogste homologie van oxo2:

```
>gi|50908553|ref|XP_465765.1| putative GLP [O. sativa (japonica-group)]  
gi|47848252|dbj|BAD22076.1| putative GLP [O. sativa (japonica-group)]  
gi|47848116|dbj|BAD21899.1| putative GLP [O. sativa (japonica-group)]
```

```
Score = 104 bits (260), Expect = 6e-22  
Identities = 49/66 (74%), Positives = 54/66 (81%)  
Frame = +2, Length = 223
```

```
Query: 8 VSVNGFPCKDPSVAQADDDFFFTGLHIRGDTNNAQGSNVTAVNVAQIPGLNTLGLISLVRID 187  
V VNGFPCKD A DFFF+GLH+ G+T N QGSNVT VNVAQIPGLNT+G+SLVRID  
Sbjct: 46 VRVNGFPCKDAKDVVAGDFFF+SGLHMAGNTTNKQGSNVTTVNVAQIPGLNTMGVSLVRID 105
```

```
Query: 188 YAPRGL 205  
YAP GL  
Sbjct: 106 YAPNGL 111
```

Op basis van deze gegevens zijn we verder gegaan met ‘genome walking’.

Er is voorlopig met twee bekende restrictie-enzymen gewerkt, maar dit heeft geen extra informatie opgeleverd over de flankerende gebieden. Doordat het project ten einde liep hebben we niet met andere primer-enzym combinaties verder gewerkt.

Northern blot

Voor het aantonen van expressie van oxo1 en/of oxo2 werd RNA geïsoleerd van tulp en lelie onder verschillende condities. Er werd gekozen voor H₂O₂ stress, zoutstress en Jasmonzuurstress. Ook werd er een infectiereeks uitgevoerd op tulp en lelie met zowel *B. cinerea*, *B. tulipae* en *B. elliptica*.

Het oorspronkelijk glyoxal/DMSO protocol voor het prepareren van de gel was niet gelukt. Achteraf bleek dat de batch glyoxal was verontreinigd met RNase. Vervolgens werd met behulp van het formamide/formaldehyde protocol (Sambrook *et al.*, 1989) een goede gel gemaakt waarvan een northern blot is gemaakt. Deze werd met oxo1 als radioactieve ³²P-probe gehybridiseerd. Helaas konden we geen transcriptiesignaal vinden voor oxo1.

Als mogelijke verklaring werd door de commissie gesuggereerd dat het oxo1 niet het veronderstelde oxalaat oxidase zou zijn dat in staat is *B. cinerea* tegen te houden. Omdat rijst een monocotyl is en volledig gesequenced is, werd een Blast uitgevoerd naar oxo-gerelateerde sequenties (zie tabel II). In *Oryza sativa* is een genfamilie van oxalaat oxidase/Germis/GLP's aanwezig van ongeveer 30 genen. Er werden 31 hits gevonden, waarvan 11 met een homologie van lager dan 45%. 26 hits werden gevonden met “germin” en 8 hits met “oxalate oxidase” (vet) uit een totaal van 88,765 unieke sequenties. De nomenclatuur was in alle gevallen onduidelijk over het bevatten van een “echt”oxalaat oxidase met een activiteit waarmee oxaalzuur kan worden omgezet tot H₂O₂. Membré en Bernier (1998) maakten in 1998 al melding dat het rijstgenoom tenminste zes verschillende genen voor oxalaat oxidase/germin-like proteïns bevat.

Door het ontbreken van goede annotatie en onduidelijkheid over de definitie van een “echt” oxalaat oxidase ten opzichte van Germis en GLP's was het niet mogelijk om inzicht te krijgen in het aantal echte oxalaat oxidases. Ondanks dat rijst en tulp/lelie sterk verschillen, is niet onaannemelijk dat ook in tulp en lelie een (kleine) oxalaat oxidase familie te verwachten is.

Tabel II: Analyse van de “TIGR Rice (*Oryza sativa*) Gene Index (OsGI)” met “germin of oxalate oxidase” http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T_index.cgi?species=rice. For links, click on link while pressing Control.

Sequentie	Beschrijving
eiwit	gi50917905 ref XP_469349.1 putative oxalate oxidase [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]
eiwit	gi50917911 ref XP_469352.1 putative oxalate oxidase [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]
eiwit	gi50917907 ref XP_469350.1 putative oxalate oxidase [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]
eiwit	gi50917909 ref XP_469351.1 putative oxalate oxidase [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]
TC216232	= UPI048998 <i>Homologue to</i> PIR T02239 T02239 germin protein type 1 - rice { <i>Oryza sativa</i> ;}, <i>partial (98%)</i>
TC216421	= UPI049001 Germin-like protein 5 (Germin-like protein 1), <i>complete</i>
TC216445	= UPIQ6YZA9 <i>Homologue to</i> PIR T02666 T02666 germin-like protein 16 - rice { <i>Oryza sativa</i> ;}, <i>complete</i>
TC218253	= UPI048997 PIR T02239 T02239 germin protein type 1 - rice { <i>Oryza sativa</i> ;}, <i>complete</i>
TC219908	UPIQ942A8 Germin (oxalate oxidase)-like protein, <i>complete</i>
TC220696	= UPI049002 PIR T02660 T02660 germin-like protein 6 - rice { <i>Oryza sativa</i> ;}, <i>complete</i>
TC238806	= UPIQ9S7K3 Germin-like protein 1 precursor, <i>complete</i>
TC238931	= UPIQ6YZ97 UP Q9XH59 (Q9XH59) Germin-like protein 2 precursor, <i>complete</i>
TC243039	= UPIQ94JF3 <i>Weakly similar to</i> UP Q8H2A6 (Q8H2A6) Germin-like protein, <i>partial (68%)</i>
TC244170	<i>weakly similar to</i> GB BAB10075.1 10176868 AB010069 germin-like protein-like { <i>A. thaliana</i> ;}, <i>partial (25%)</i>
TC246942	= UPIQ6YZ99 <i>Homologue to</i> UP Q9XH59 (Q9XH59) Germin-like protein 2 precursor, <i>complete</i>
NP392765	= BAB64691.1 GI 15528796 Germin (oxalate oxidase)-like protein [<i>Oryza sativa</i>]
NP918463	= BAD05732.1 GI 40253795 putative germin A [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]
NP918465	= BAD05734.1 GI 40253797 putative germin A [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]
NP918468	= BAD05737.1 GI 40253800 putative germin A [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]
NP919760	= BAD03336.1 GI 38637079 putative germin A [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]
BI804827	<i>homologue to</i> PIR T02591 T025 germin-like protein 3 - rice (fragment), <i>partial (18%)</i>
BX901042	<i>homologue to</i> GP 15528795 dbj germin (oxalate oxidase)-like protein { <i>Oryza sativa</i> }, <i>partial (22%)</i>
CA757490	<i>weakly similar to</i> GP 4996622 dbj germin-like protein { <i>Atriplex lentiformis</i> }, <i>partial (38%)</i>
CA760001	<i>similar to</i> PIR T02660 T026 germin-like protein 6 - rice, <i>partial (28%)</i>
CF294682	<i>similar to</i> PIR T02239 T022 germin protein type 1 - rice, <i>partial (44%)</i>
BI800119	<i>homologue to</i> PIR T02591 T02 germin-like protein 3 - rice (fragment), <i>partial (63%)</i>
BI801787	<i>homologue to</i> PIR T02591 T025 germin-like protein 3 - rice (fragment), <i>partial (27%)</i>
BX898657	GP 11176997 db germin-like protein 1 { <i>Oryza sativa</i> }, <i>partial (7%)</i>
CF302494	<i>similar to</i> PIR T02239 T022 germin protein type 1 - rice, <i>partial (28%)</i>
CF318785	<i>similar to</i> GP 5499732 gb A germin-like protein 2 precursor { <i>Oryza sativa</i> } [<i>Oryza sativa</i>], <i>partial (36%)</i>
CA305834	<i>homologue to</i> GP 2266668 emb oxalate oxidase { <i>Hordeum vulgare</i> }, <i>partial (20%)</i>

Discussie

Onderzoek naar *Botrytis* resistentie is al lang een belangrijk studieonderwerp. Al sinds de ontdekking van Bordeaux pap (een oplossing van kopersulfaat en ongebluste kalk waarmee men probeerde te voorkomen dat druiven werden gestolen uit de wijngaard bleek een effectief middel tegen *Botrytis*) is men bezig om *Botrytis* te bestrijden met fungicides, of probeert men aantasting te voorkomen door het gebruik van *Botrytis*-resistent uitgangsmateriaal. Door de behoefte om minder bestrijdingsmiddelen te gebruiken is het noodzakelijk om onderzoek uit te voeren naar *Botrytis* resistentie.

Het uitgangspunt van dit onderzoek is het fenomeen dat monocotyle gewassen niet of nauwelijks kunnen worden aangetast door *Botrytis cinerea*, terwijl bijna elke monocotyl wel een monocotyl-specifieke *Botrytis* heeft waardoor een compatibele pathogeen-waard combinatie ontstaat.

Het mechanisme dat voorkomt dat *B. cinerea* niet in staat is om een monocotyl aan te tasten geeft een bron van informatie om te speculeren over resistentiemechanismen die gebruikt kunnen worden voor de monocotyl-specifieke *Botrytis* ssp. De lijn welke is gevolgd in dit onderzoek is de hypothese dat het genproduct oxalaat oxidase verantwoordelijk is voor het feit dat *B. cinerea* geen monocotylen kan aantasten. In de literatuur is oxalaat oxidase ook al sinds 1996 in verband gebracht met resistentie tegen de necrotrofe schimmel *Sclerotinia sclerotiorum*.

Recentelijk zijn er een aantal artikelen verschenen die het aannemelijk maken dat oxalaat oxidase inderdaad een sleutelrol heeft in resistentie tegen *S. sclerotiorum*. Aangezien *Botrytis cinerea*, net als *S. sclerotiorum*, een necrotroof is welke oxaalzuur uitscheidt, zou oxalaat oxidase ook een resistentiefactor tegen *Botrytis* kunnen zijn:

Hu *et al.* (2003) onderzocht transgene zonnebloemplanten met een oxalaat oxidase gen van tarwe. De transgene zonnebloemen bleken een verhoogde resistentie tegen *S. sclerotiorum* te hebben door het toegevoegde oxo-gen.

Kandidaat resistentiegenen in rijst zijn door Ramalingam *et al.* (2003) in een merkeronderzoek bekeken. Er werden QTL's (Quantitative Trait Loci) gevonden voor onder andere oxalaat oxidase.

In een artikel van Simmonds *et al.* (2004) is beschreven hoe het van tarwe afkomstige oxalaat oxidase in een aantal dicotyle gewassen is ingebouwd. Soja vertoonde hierbij een verhoogde resistentie voor *S. sclerotiorum*. Tomaat is ook getransformeerd met het oxalaat oxidase gen. In een samenwerking met Simmonds zijn we momenteel een onderzoek aan het voorbereiden om deze tomaten ook op *B. cinerea* resistentie te testen.

Onderzoek aan Engels raaigras (*Lolium perenne*, Le Deunff *et al.*, 2004) toont aan dat door een Jasmonzuur- of H₂O₂ gift de expressie van oxalaat oxidase geïnduceerd wordt. Dit is opgesplitst voor de vier bekende oxalaat oxidases d.m.v. een northern blot, hoewel de controles niet altijd correct lijken. De auteurs zien oxalaat oxidase als producent van H₂O₂ welke gebruikt kan worden als H₂O₂ initiator voor de verdediging tegen pathogenen.

Het meest recente onderzoek naar de rol van oxaalzuur en necrotrofen (Favaron *et al.*, 2004) in soja benadrukt dat oxaalzuur een pathogeniciteitsfactor is (Godoy *et al.*, 1990) en dat planten die dit oxaalzuur door middel van oxalaat oxidase kunnen afbreken, resistent zijn tegen *S. sclerotiorum* (Donaldson *et al.*, 2001). Het onderzoek richt zich op endopolygalacturonases (endo-PG) welke door *S. sclerotiorum* worden uitgescheiden. Hiervan is een zure (PGa) en een basische vorm (PGb) aanwezig. De door de schimmel uitgescheiden oxaalzuur bevordert de activiteit van PGb terwijl de remming van PGa door het PolyGalacturonase-Inhibiting Protein (PGIP) van soja afneemt.

Het hier beschreven onderzoek geeft een aantal handvatten om de *Botrytis cinerea* resistentie in monocotylen te verklaren. Zo blijken *Botrytis cinerea*, *B. tulipae* en *B. elliptica* een significante hoeveelheid oxaalzuur uit te scheiden op een agarplaat. Deze verkleuring kan slechts nagebootst worden door een equivalent van 100 mM oxaalzuur. Deze hoeveelheid oxaalzuur geeft op tulpenblad een necrose welke bepalend kan zijn voor een succesvolle infectie. Toch kan de specificiteit (tulp-*B. tulipae*, lelie-*B. elliptica*) hierdoor niet verklaard worden.

Inoculaties van *B. cinerea*, *B. elliptica* en *B. tulipae* op vier tulpencultivars is voorafgegaan door blad te behandelen met verschillende concentraties oxaalzuur of waterstof peroxide. Allereerst komt hier uit naar voren dat cv. Monte Carlo de hoogste resistentie heeft tegen *Botrytis*. Cultivar Christmas Marvel is de meest vatbare. Verder is ook waar te nemen dat van de geteste oxaalzuurconcentraties, alleen 100 mM een necrotische lesie op tulp geeft. Bij alle cultivars is de *B. tulipae* aantasting zonder 100 mM oxaalzuur groter dan met 100 mM oxaalzuur. *B. cinerea* en *B. elliptica* lijken een hogere aantasting te hebben bij 100 mM oxaalzuur. In een grotere, statistisch verantwoorde, proefopzet moet dit herhaald worden in een gewarde bladpositie om bladeffecten uit te sluiten.

B. cinerea, *B. tulipae* en *B. elliptica* produceren waterstof peroxide (H_2O_2) in agarplugs met sporulerend mycelium. Het is aannemelijk dat wanneer deze *Botrytis* deze hoeveelheid H_2O_2 op blad zou uitscheiden, er een defensieve respons in het blad opgewekt wordt. De zo gevormde necrotische lesie biedt geen weerstand meer tegen *Botrytis* en kan vervolgens geïnfecteerd worden. Deze strategie komt overeen met de infectie van tomaat door *Botrytis* (Prins, 2001); Bij inoculatie is er na 16-18 uur eerst een primaire lesie zichtbaar. Deze kan vervolgens uitgroeien tot secundaire, spreidende lesie.

Met behulp van een similariteits-dendrogram van ~300 oxo-gerelateerde sequenties uit de database is een consensus sequentie gevonden op basis waarvan gedegenereerde primers werden ontworpen. Deze zijn gebruikt om een oxalaat oxidase uit lelie en tulp op te sporen. Voor lelie is dit gelukt en zijn er twee oxo-genfragmenten gekloneerd en is de basenvolgorde bepaald. De validatie van de betrokkenheid van deze genfragmenten in een infectie met *Botrytis* en onder verschillende stresssituaties zoals H_2O_2 , zout en Jasmonzuur is met een northern blot uitgevoerd. Op de ontwikkelde film was echter geen signaal te zien waardoor we moeten concluderen dat oxo1 niet betrokken is bij infectie en stress zoals getest in dit experiment.

Een mogelijke verklaring voor het ontbreken van oxo-transcripten in dit experiment is de aanwezigheid van een kleine genfamilie van oxalaat oxidase genen zoals aangetroffen bij een andere monocotyl, rijst. Het oxo1 van de in dit experiment geïsoleerde oxo1 en oxo2 van lelie kan een niet-actieve vorm zijn van een genfamilie.

Conclusies

In dit onderzoek naar de rol van oxaalzuur, oxalaat oxidase en waterstof peroxide in de interactie tussen *Botrytis* en tulp en lelie kunnen de volgende conclusies getrokken worden:

- De groeisnelheid van de gebruikte *Botrytis* isolaten is voor *B. cinerea* het hoogste, gevolgd door *B. tulipae* en *B. elliptica*.
- *B. cinerea*, *B. tulipae* en *B. elliptica* produceren allen oxaalzuur. Dit wordt door de schimmel op plaat in het medium uitgescheiden en is aantoonbaar in gebieden voorafgaand aan myceliumgroei. De secretie is gerelateerd aan de groeisnelheid.
- *B. cinerea*, *B. tulipae* en *B. elliptica* produceren allen waterstof peroxide in vloeistofcultuur. *B. cinerea* produceert als eerste H₂O₂.
- Uit lelie ('Connecticut King') zijn twee genfragmenten geïsoleerd met een sequentiehomologie met oxalaat oxidase. Fragment 1 (*BcOxo1*) is als radioactieve probe gehybridiseerd op een northern blot met RNA wat geïsoleerd is uit blad van tulp en lelie. Hierop was geen transcript te zien van *BcOxo1*.
- Het lijkt aannemelijk dat er meerdere oxalaat oxidase-gerelateerde sequenties in lelie aanwezig zijn. Van de twee fragmenten die in dit onderzoek zijn opgepikt, codeerde *oxo1* niet voor een oxalaat oxidase dat is betrokken bij de resistentie tegen *Botrytis*.

Aanbevelingen voor verder onderzoek

Het hier beschreven onderzoek naar de rol van oxalaat oxidase in de resistentie van de monocotyle bolgewassen lelie en tulp heeft niet kunnen bevestigen dat het genproduct oxalaat oxidase een belangrijke rol speelt in het infectieproces. De reden hiervoor is, dat de genen van oxalaat oxidase mogelijk deels uitmaken van een kleine genfamilie. In dit onderzoek zijn slechts twee mogelijke genfragmenten geanalyseerd. *Oxo1* lijkt geen actieve rol te spelen bij het infectieproces.

In vervolgonderzoek zal specifiek naar actieve transcriptie-elementen van oxalaat oxidase gezocht moeten worden. Dit kan bijvoorbeeld door uit poly(A)⁺ RNA wat verkregen is uit bladmateriaal van resistente lelie en tulp in interactie met *Botrytis cinerea*, cDNA te maken. Op dit cDNA kan vervolgens met *oxo*-specifieke primers naar oxalaat oxidase(s) gezocht worden welke bij de interactie betrokken zijn. Deze relatief makkelijke procedure zal alleen actieve *oxo*-sequenties genereren en met deze sequenties kan in een northern blot worden aangetoond of er een significante inductie van transcriptieniveaus is waar te nemen. Een meer volledige proefopzet is een benadering waarbij silencing van oxalaat oxidases wordt bewerkstelligd. Hierdoor kunnen in theorie alle *oxo*'s worden uitgeschakeld en is het effect hiervan in een bioassay te toetsen.

Een ander cruciaal experiment is al genoemd. Dit is de assay van tomaat welke is getransformeerd met het oxalaat oxidase gen van gerst (Simmonds *et al.*, 2004). Deze tomatenplanten zijn al getest met *Sclerotinia sclerotiorum* en hier is een significante resistentie waargenomen. Normaal is tomaat vatbaar voor wildtype *B. cinerea* (Prins, 2001). De toevoeging van oxalaat oxidase aan tomaat zal in een biotoets kunnen aantonen of er verschil in infectie is. Dit is een onomstotelijk bewijs van het effect van één enkel monocotyl resistentiegen tegen *B. cinerea*.

Als *Botrytis elliptica* effectief door een resistentie Oriental lelie kan worden buitengesloten door generatie van waterstof peroxide als gevolg van afbraak van oxaalzuur, kan dit mogelijk

verklaard worden doordat een algemeen resistentiemechanisme wordt aangeschakeld door H_2O_2 . Dit zou een positief effect kunnen hebben op *Fusarium* resistentie. Oxo2 is nog niet getest op activiteit bij de infectie met *Botrytis*. Hybridisatie met dit fragment geeft uitsluiting over de betrokkenheid van oxo2 bij de infectie. *Botrytis* inoculatie in combinatie met oxaalzuur of waterstof peroxide lijkt de infectie te beïnvloeden. Zo lijkt de aantasting van tulp door *B. tulipae* verminderd te worden door 100 mM oxaalzuur. *B. elliptica* en *B. cinerea* lijken echter een grotere lesie te ontwikkelen. In een statistische verantwoord experiment moet de toets herhaald worden om bladpositie-effecten uit te sluiten en de lesiegrootte significant te maken.

Literatuur

- Donaldson, P. A., Anderson, T., Lane, B. G., Davidson, A. L., and Simmonds, D. H. 2001. Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat *gf-2.8* (*germin*) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 59:297-307.
- Dumas, B., Freyssinet, G., and Pallett, K. E. 1995. Tissue-specific expression of germin-like oxalate oxidase during developmental and fungal infection of barley seedlings. *Plant Physiol.* 107:1091-1096.
- Favaron, F. 2001. Gel detection of *Allium porrum* polygalacturonase-inhibiting protein reveals a high number of isoforms. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 58:239-245.
- Godoy, G., Steadman, J. R., Dickman, M. B., and Dam, R. 1990. Use of mutant to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 37:179-191.
- Hu, X., Bidney, D. L., Yalpani, N., Duvick, J. P., Crasta, O., Folkerts, O., and Lu, G. H. 2003. Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiol.* 133:170-181.
- Le Deunff, E., Davoine, C., Le Dantec, C., Billard, J. P., and Huault, C. 2004. Oxidative burst and expression of germin/oxo genes during wounding of ryegrass leaf blades: comparison with senescence of leaf sheaths. *Plant J.* 38:421-431.
- Liu, B., Zhang, S. H., Zhu, X. Y., Yang, Q. Y., Wu, S. Z., Mei, M. T., Mauleon, R., Leach, J., Mew, T., and Leung, H. 2004. Candidate defense genes as predictors of quantitative blast resistance in rice. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:1146-1152.
- Membré, N. and Bernier, F. (1998) The rice genome expresses at least six different genes for oxalate oxidase/germin-like proteins (accession N° AF032971, AF032972, AF032973, AF032974, AF032975, AF032976) (PGR 98-021). *Plant Physiol.* 116:868.
- Prins, T. W., Tudzynski, P., Von Tiedemann, A., Tudzynski, B., ten Have, A., Hansen, M. E., Tenberge, K., and Van Kan, J. A. L. 2000. Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. In: *Fungal Pathology* (J. Kronstad, Ed.). Kluwer Academic Publishers. pp. 33-64.
- Prins, T. W. 2001. Identification and functional analysis of *Botrytis cinerea* genes induced during infection of tomato. Page vii + 114 pp. Department of Phytopathology, Wageningen Universiteit, Wageningen.
- Quidde, T., Buttner, P., and Tudzynski, P. 1999. Evidence for three different specific saponin-detoxifying activities in *Botrytis cinerea* and cloning and functional analysis of a gene coding for a putative avenacinase. *Eur. J. Plant Pathol.* 105:273-283.
- Ramalingam, J., Cruz, C. M. V., Kukreja, K., Chittoor, J. M., Wu, J. L., Lee, S. W., Baraoidan, M., George, M. L., Cohen, M. B., Hulbert, S. H., Leach, J. E., and Leung, H. 2003. Candidate Defense genes from rice, barley, and maize and their association with qualitative and quantitative resistance in rice. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16:14-24.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Page xxxviii + 1546 pp. In: 1989, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Simmonds, J., Cass, L., Routly, E., Hubbard, K., Donaldson, P., Bancroft, B., Davidson, A., Hubbard, S., and Simmonds, D. 2004. Oxalate oxidase: a novel reporter gene for monocot and dicot transformations. *Mol. Breed.* 13:79-91.