



Screening van genen, metabolieten en afweereiwitten

Betrokken bij natuurlijke afweer tegen Botrytis

Jantineke Hofland-Zijlstra, Rob van den Broek, Suzanne Breeuwsma,
Wim van Wensveen, Luc Stevens¹, Ric de Vos¹, Nathalie Verhoef² en Peter Balk²

1. Plant Research International, Droevendaalsesteeg 1, Wageningen, 2. NSure, Binnenhaven 5, Wageningen

Rapport GTB-1328

Referaat

Wageningen UR Glastuinbouw, Plant Research International en NSure hebben gezamenlijk gewerkt aan het screenen van genen, metabolieten en afweereiwitten die betrokken zijn bij natuurlijke afweerreacties tegen Botrytis in snijbloemen. Dit project is gefinancierd door Productschap Tuinbouw en NSure en begeleidt door LTO Glaskracht. Uitkomsten van klimaatkasttesten met de pilotgewassen pottomaat en potgerbera laten zien dat verhoging van systemische afweerstoffen tegen Botrytis mogelijk is. Behandeling van individuele bladeren met jasmonzuur werkte zelfs systemisch door in verminderde gevoeligheid van de bloemen voor Botrytis. Gevoeligheid voor Botrytis is sterk gerelateerd aan productie van jasmonzuur, maar dit onderzoek heeft nieuwe genen en plantmetabolieten naar voren gebracht die niet eerder in relatie gebracht zijn tot Botrytis infectie en –weerbaarheid en waarvan sommige zelfs nog niet beschreven staan in bekende databanken. Hierdoor zijn nieuwe wegen geopend om uitgangsmateriaal te beoordelen op Botrytis gevoeligheid. Maar ook om bijvoorbeeld effecten van teelt- en klimaatmaatregelen op natuurlijke afweerreacties in tuinbouwgewassen te toetsen. De betrouwbaarheid zal toenemen als de potentiële markers in meerdere, onafhankelijke proeven bevestigd gaan worden, bijvoorbeeld in verschillende gewassen en rassen, en met verschillende Botrytis stammen. Doorontwikkeling van deze kennis is essentieel om versneld grote sprongen te kunnen maken in het samenstellen van effectieve en robuuste beheersstrategieën tegen Botrytis.

Abstract

Wageningen UR Greenhouse Horticulture, Plant Research International and NSure have joint forces to screen the expression of genes, metabolites and pathogen-related enzymes in relation to systemic defence mechanisms against Botrytis in cut flowers. Tomato was used as a model, while gerbera was chosen as a reference cut flower. Plants were either pre-treated with specific chemicals known to be induced in plant pathogen interactions, i.e. jasmonic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA, a glucanase/chitinase-inducer) or non-treated (controls) before being infected with Botrytis. Botrytis outgrowth and damage on leaves and flowers were scored visually. At the same time leaf samples were taken for large-scale screening using both transcriptomics (gene profiling) and metabolomics (metabolite profiling), as well as the activity of specific defense-related enzymes was studied, in order to identify markers for the level of Botrytis resistance. Sensitivity of plants to Botrytis correlated well with the accumulation of the pathogen-related plant hormone jasmonic acid and the activity of the defense-related enzyme glucanase. Moreover, the accumulation patterns of a large number of genes and metabolites, many of which have not been described before, coincided with either Botrytis infection, chemical-pretreatment or plant resistance level. These genes and metabolites are thus potential markers for infection of and plant resistance to Botrytis. However, the robustness and generic use of the detected markers need to be verified in independent follow-up experiments, for instance using other plant species or varieties as well as other Botrytis strains.

Rapportgegevens

Rapport GTB-1328

Projectnummer: 3242168500

PT nummer: 14818



Disclaimer

© 2014 Wageningen UR Glastuinbouw (instituut binnen de rechtspersoon Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek), Postbus 20, 2665 MV Bleiswijk, Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk, T 0317 48 56 06, F 010 522 51 93, E glastuinbouw@wur.nl, www.wageningenUR.nl/glastuinbouw. Wageningen UR Glastuinbouw.

Wageningen UR Glastuinbouw aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

Adresgegevens

Wageningen UR Glastuinbouw

Postbus 20, 2665 ZG Bleiswijk

Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk

T +31 (0)317 48 56 06

F +31 (0)10 522 51 93

Inhoud

	Voorwoord	5
	Samenvatting	7
1	Inleiding	9
	1.1 Achtergrond	9
	1.2 Doel van het onderzoek	10
	1.3 Introductie plantweerbaarheid	10
	1.4 Plan van Aanpak	12
2	Ziektetoets met tomaten potplanten	15
	2.1 Doel	15
	2.2 Uitvoering	15
	2.3 Resultaten	16
	2.4 Conclusies	17
3	Ziektetoets met gerbera potplanten	19
	3.1 Doel	19
	3.2 Uitvoering	19
	3.3 Resultaten	19
	3.3.1 Ziekteontwikkeling op de bladeren	19
	3.3.2 Ziekteontwikkeling op de bloemen	20
	3.4 Conclusies	20
4	Specifieke meting van signaalstoffen en brede metabolietprofielering	21
	4.1 Doel	21
	4.2 Aanpak	21
	4.3 Gerichte screening SA en JA	21
	4.4 Brede screening metabolieten	23
	4.4.1 Invloed van infectie	24
	4.4.1.1 Tomaat	25
	4.4.1.2 Gerbera	27
	4.4.2 Specifieke effecten van jasmonzuur	28
	4.4.2.1 Tomaat	28
	4.4.2.2 Gerbera	30
	4.4.3 Specifieke invloed van INA	32
	4.4.3.1 Tomaat	32
	4.4.3.2 Gerbera	33
	4.5 Conclusie	33
5	Glucanase activiteit	35
	5.1 Doel	35
	5.2 Uitvoering	35
	5.3 Resultaten	35
	5.4 Conclusie	37

6	Genenscreening	39
6.1	Doel	39
6.2	Uitvoering en Resultaten	39
6.2.1	Profilering van het tomaten transcriptoom door middel van NGS	39
6.2.2	Identificatie van tomaten genen die betrokken zijn bij een Botrytis infectie	40
6.2.3	Invloed van jasmonzuur (JA) op tomatenplanten	42
6.2.4	Invloed van INA op tomatenplanten	46
6.2.5	Bruikbaarheid van geïdentificeerde tomaat pathogeen gerelateerde genen in gerbera	48
6.2.6	Profilering van het gerbera transcriptoom door middel van NGS	48
6.2.7	Identificatie van gerbera genen die betrokken zijn bij een botrytis infectie	49
6.3	Conclusie	53
7	Conclusie en Discussie	54
7.1	Chemische activatie systemische afweer is mogelijk	54
7.2	Sterke natuurlijke afweer in gerbera	54
7.3	Cultivarverschillen	55
7.4	Activatie van bladeren werkt door in bloem	55
7.5	Negatieve interactie SA en JA?	56
7.6	Veelbelovende, nieuwe merkers gevonden met moderne -omics technologieën.	56
7.7	Perspectieven	56
8	Aanbevelingen	57
9	Literatuur	59
	Bijlage I. Salicylzuur biosynthese	61
	Bijlage II. Jasmonzuur biosynthese	63

Voorwoord

Voor u ligt een bijzonder rapport waarin de eerste stappen zijn gezet om meer grip te krijgen op het sturen van weerbaarheid van snijbloemen tegen Botrytis. Hiervoor was een krachtenbundeling nodig van praktijkonderzoekers met meer fundamentele onderzoekers en het bedrijfsleven. Het was een gezamenlijke uitdaging om de uitkomsten ervan te vertalen voor een breed publiek. We hopen dan ook dat dit rapport een basis zal vormen voor het ontwikkelen van effectieve stuurparameters voor weerbare planten. Dit onderzoek is gefinancierd door het Productschap Tuinbouw en met een private bijdrage van NSure. Graag wil ik van de mogelijkheid gebruik maken om LTO Glaskracht (Helma Verberkt) te bedanken voor de initiatie en begeleiding van dit onderzoek samen met de landelijke gewascommissie gerbera.

Jantineke Hofland-Zijlstra, 14 november 2014

Samenvatting

Botrytis leidt in snijbloemen nog steeds tot veel uitval. Resistente rassen zijn niet beschikbaar. Wel zijn er duidelijke verschillen in gevoeligheid tussen cultivars aanwezig. Eén van de manieren om planten zich beter te laten weren tegen Botrytis is om de aanmaak van natuurlijke afweerstoffen te activeren. Kennis over het primen van planten in sierteeltgewassen staat echter nog in de kinderschoenen. In dit onderzoek is door Wageningen UR Glastuinbouw, Plant Research International en NSure gezamenlijk onderzocht welke genen, afweereiwitten en plantfenolen een rol spelen bij de afweerprocessen tegen Botrytis. Dit project is gefinancierd door Productschap Tuinbouw met een private bijdrage van NSure.

In klimaatkasttesten met pottomaat en potgerbera zijn onder gecontroleerde klimaatcondities twee chemische stoffen (elicitors) getest die de systemische afweer tegen necrotrofe (zoals Botrytis) of biotrofe (zoals meeldauw) organismen kunnen aanzetten. Enkele dagen na toediening zijn de planten besmet met Botrytis om gericht de plantmetabolieten en genen te bestuderen die specifiek aangemaakt worden bij blootstelling aan een infectie.

Uitkomsten van klimaatkasttesten met de pilotgewassen pottomaat en potgerbera laten zien dat verhoging van systemische afweerstoffen tegen Botrytis mogelijk is. Behandeling van individuele bladeren met jasmonzuur werkte zelfs systemisch door in verminderde gevoeligheid van de bloemen voor Botrytis. Gevoeligheid voor Botrytis is sterk gerelateerd aan productie van jasmonzuur.

Bij het vergelijken van inhoudsstoffen vóór en na infectie zien we zowel bij tomaat als gerbera dat er meer dan 90 metabolieten een verandering laten zien, zowel positief als negatief. Dit betreft voor een groot deel nieuwe stoffen die niet eerder opgeslagen zijn in bestaande databanken. Bij de metabolietscreening zijn zowel in tomaat als gerbera een aantal interessante metabolieten gevonden met zowel een korte (24 uur) als langere inductietijd na 7 dagen. In tomaat is met name cafeïnezuur een metaboliet die zeer sterk reageert op behandeling met de chemische activator jasmonzuur en goede perspectieven biedt als indicator voor afweerreacties tegen necrotrofe organismen zoals Botrytis.

In zowel tomaat als gerbera kwamen duizenden genen verschillend tot expressie na een infectie met Botrytis. Een aantal van deze genen met een korte (24 uur) of een lange inductietijd (7 dagen) zijn verder onderzocht en zouden in de toekomst gebruikt kunnen worden om in een vroeg stadium Botrytis op te sporen in tomaat en gerbera. Een jasmonzuur behandeling in tomaat zorgde voor een genactiviteitsverandering van duizenden genen, waarvan een honderdtal een zeer sterke verandering vertoonden. Op basis van de bevindingen met de genenscreening, lijken JA specifieke genen kort geïnduceerd te worden na infectie in tomaat, terwijl INA (indool nicotine acid) specifieke genen een langdurige activiteit na infectie vertonen.

Dit onderzoek heeft nieuwe genen en plantmetabolieten in pottomaat en potgerbera in kaart gebracht die niet eerder beschreven staan in bekende databanken en zijn eerste verbanden gelegd tussen de verschillende meetmethoden. Hierdoor zijn nieuwe wegen geopend om op een alternatieve manier uitgangsmateriaal in de sierteelt te beoordelen op Botrytis gevoeligheid. Maar ook om effecten van teelt- en klimaatmaatregelen op natuurlijke afweerreacties in tuinbouwgewassen te toetsen - onafhankelijk van klimaatcondities. De betrouwbaarheid zal toenemen als dit in meerdere onafhankelijke proeven bevestigd gaat worden, in meer verschillende gewassen en met verschillende Botrytis stammen. Doorontwikkeling van deze kennis is essentieel om versneld grote sprongen te kunnen maken in het samenstellen van effectieve duurzame beheersstrategieën tegen Botrytis.

1 Inleiding

1.1 Achtergrond

De grijze schimmel, *Botrytis cinerea* is nog steeds een groot probleem in snijbloemen en in vele andere sierteeltgewassen, zowel in de teelt als in de naoogst. De schimmel tast bladeren, stengels en bloemen aan. Eén van de problemen is dat voor *Botrytis* op dit moment nog geen resistente rassen beschikbaar zijn (Williamson 2007). In tomaat wordt er gewerkt aan robuuste polygene resistentie op basis van QTL's (quantitative trait loci). En wellicht bieden nieuwe ontwikkelingen op het gebied van RNAi – het inactiveren van genen – in de toekomst ook meer mogelijkheden voor gevoelige rassen. Verschillen in tolerantie voor *Botrytis* tussen cultivars is wel sterk aanwezig en een sterke aanwezigheid van specifieke plantfenolen kunnen daarin een rol spelen (Agrios, 2005).

Naast de invloed vanuit het uitgangsmateriaal vertoont de schimmel een sterke interactie met klimaatomstandigheden. De sporen zijn namelijk afhankelijk van vocht voor het kiemingsproces. Zodra condities bevorderlijk worden voor snelle temperatuurswisselingen en langdurige periodes (4-5 uur) met hoge luchtvochtigheden (> 87-93%) krijgen de sporen kans om te kiemen (Köhl *et al.* 2006). In de praktijk is de belangrijkste beheersmaatregel dan ook gericht op vochtbeheersing, zodat sporen geen kans krijgen om te kiemen. Dit gaat vaak nog gepaard met hogere energiekosten.

Om een gewas te infecteren zijn wondvlakken doorgaans vereist. Gezond, onbeschadigd plantenweefsel wordt niet snel geïnfecteerd door *Botrytis*sporen. De sporen dringen alleen in het gewas op grensvlakken met afstervend weefsel. Dit zijn goede bronnen van voldoende voedingsstoffen en vocht. Wondvlakken kunnen optreden bij gewasverzorging of bij afstervend bladmateriaal.

De snelheid waarin een infectie verloopt, kan sterk afhankelijk zijn van teeltcondities, bijvoorbeeld openheid van een gewas, plantdichtheid, lichthoeveelheid en -samenstelling of voedingsstoffen (calcium, stikstof) (Hofland-Zijlstra *et al.* 2014, Van Os *et al.* 2010, Dik & Wubben 2007). Tegelijkertijd is het lastig om vroegtijdig de risicomomenten goed in te schatten, zodat planten vaak al latent geïnfecteerd zijn geraakt en er in het stadium van zichtbare symptomen snelle verspreiding kan plaatsvinden. Om de risico's op infecties te ondervangen worden doorgaans systemische fungiciden ingezet. Het gebruik van natuurlijke of biologische producten wordt op dit moment beperkt toegepast als gevolg van beperkte toelating, arbeidsintensievere toepassingen (frequenter toediening), hogere kostprijs of onbekendheid met de werkzaamheid.

In de naoogst in sierteeltgewassen blijft *Botrytis* nog steeds een probleem doordat deze bruine lesies (smet) op bloemen veroorzaakt. Hierdoor vermindert de sierwaarde en houdbaarheid. Dit kan bijvoorbeeld optreden door het ontstaan van vochtige condities in de keten (bijv. door snelle wisselingen in omgevingstemperaturen). Tegelijkertijd lijkt ook hier sprake van een interactie met de teeltomstandigheden waaronder de bloemen gevormd zijn. Ook hier liggen kansen voor verbetering van gewaskwaliteit in de teeltfase als het beter bekend is hoe daar gericht op is te sturen.

De Wageningen UR afdelingen Glastuinbouw en Plant Research International (PRI) hebben de afgelopen jaren meer strategische kennis ontwikkeld over natuurlijke afweerstoffen in planten in relevante glastuinbouwgewassen, zoals tomaat en komkommer. Daarbij was het in eerste instantie vooral de uitdaging om deze stoffen te kunnen meten in relevante glastuinbouwgewassen zoals tomaat en om betrouwbare toetsprotocollen te ontwikkelen om effecten van teeltcondities zoals licht en plantversterkende producten op de afweereiwitten inzichtelijk te maken. De grootste kennisslagen zijn tot nu toe gemaakt in het afweersysteem dat een plant aanschakelt tegen biotrofe schimmels, met als modelsysteem echte meeldauw in tomaat. Hierbij is het gelukt om de betrokken afweereiwitten nauwkeurig te bepalen en de eerste verbanden te leggen met genexpressie methoden.

In dit project was het doel om kennis te ontwikkelen over de afweerreacties die een plant aanschakelt tegen Botrytis en om dit te toetsen in een relevant sierteeltgewas, zowel op de groene plantendelen als op de (houdbaarheid van) bloemen. Met deze informatie zijn de effecten van teelt- en klimaatmaatregelen op de natuurlijke afweerreacties van planten meetbaar en inzichtelijk te maken. Deze kennis legt ook de basis om vervolgens daar in de teeltfase gericht op te gaan sturen, zodat ingrijpen met curatieve beheersmaatregelen minder snel nodig zal zijn.

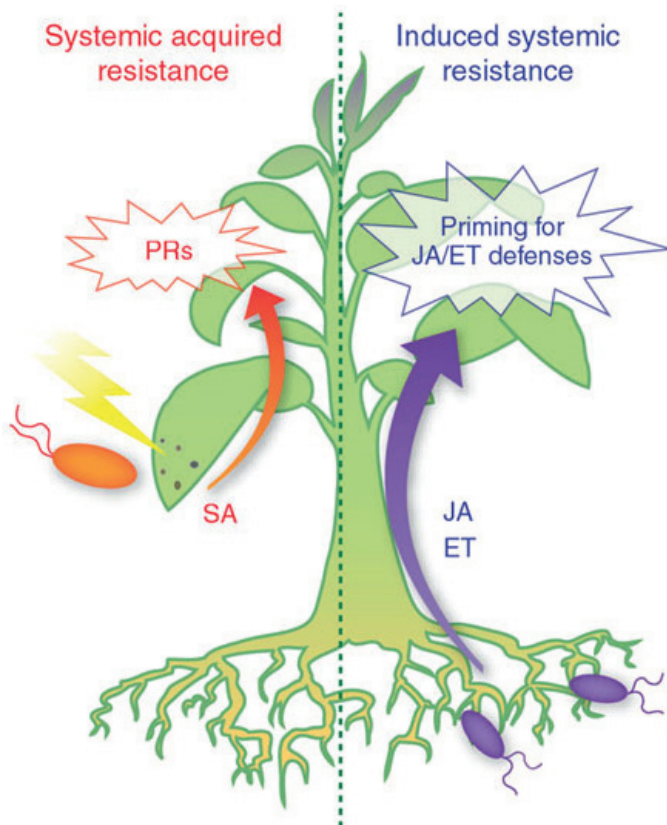
1.2 Doel van het onderzoek

1. Kennis ontwikkelen ten aanzien van een breed spectrum van genen en metabolieten die mogelijk betrokken zijn bij afweer en weerbaarheid van snijbloemen tegen Botrytis (en wellicht in de toekomst breder bij potplanten) en dit valideren tegen de bestaande specifieke meetmethoden die ontwikkeld zijn voor toetsing van Botrytis gevoeligheid.
2. Aantonen van relatie tussen gewaskwaliteit in de teeltfase en de gevoeligheid voor de ontwikkeling van Botrytisvlekken op groene bladdelen en houdbaarheid van bloemen in de naoogstfase.
3. Strategisch inzicht verkrijgen of geïnduceerde weerstand tegen echte meeldauw niet ten koste gaat van de weerstand tegen Botrytis. Met name voor die teelten waar beide ziekteverwekkers een rol spelen is het belangrijk om hier toekomstige beheersstrategieën op af te kunnen stemmen.

1.3 Introductie plantweerbaarheid

Planten hebben verschillende verdedigingsmechanismen ontwikkeld om ziekten en plagen te weren. Een deel van de chemische en fysische barrières zijn structureel aanwezig zoals de epidermis, celwanden en antimicrobiële chemische stoffen. Een andere verdedigingsreactie wordt pas geactiveerd zodra er een infectie en een hypergevoeligheid respons (HR) plaatsvindt waarbij de plant de verspreiding beperkt door lokaal een paar cellen te laten afsterven. De HR kan leiden tot een systemische afweerreactie. Daarbij wordt via een lokale infectie op één blad een systemisch signaal afgegeven naar niet-geïnfecteerde bladeren, zodat deze bij een volgende infectie minder gevoelig zijn.

De plant weert zich via twee afzonderlijke afweerroutes tegen biotrofe (meeldauw) en necrotrofe (Botrytis) ziekteverwekkers. Figuur 1.1 toont een overzicht van deze twee belangrijke systemische afweerroutes in planten. Links wordt aangegeven dat een plant zich weert tegen biotrofe organismen (meeldauw, Fusarium, bacteriën, virussen). Een lokale infectie zorgt ervoor dat de plant de signaalstof methylsalicylaat produceert, dat vervolgens de aanmaak van oa. salicylzuur en enzymactiviteit (glucanases, chitinases) in andere plantendelen stimuleert. Salicylzuur is een aspirine-achtige stof, die ook veel in wilgenbast (Salix) wordt aangetroffen en die ter plekke direct de kieming van sporen belemmert. Rechts in de figuur wordt de afweerreactie tegen necrotrofe organismen (Botrytis, Phytophthora) aangegeven waarbij jasmonzuur en ethyleen zowel als signaalstoffen functioneren als aangemaakt worden in niet-geïnfecteerde bladeren. Niet ziekteverwekkende, saprotrofe bodembacteriën spelen bij deze geïnduceerde resistentie een belangrijke rol.

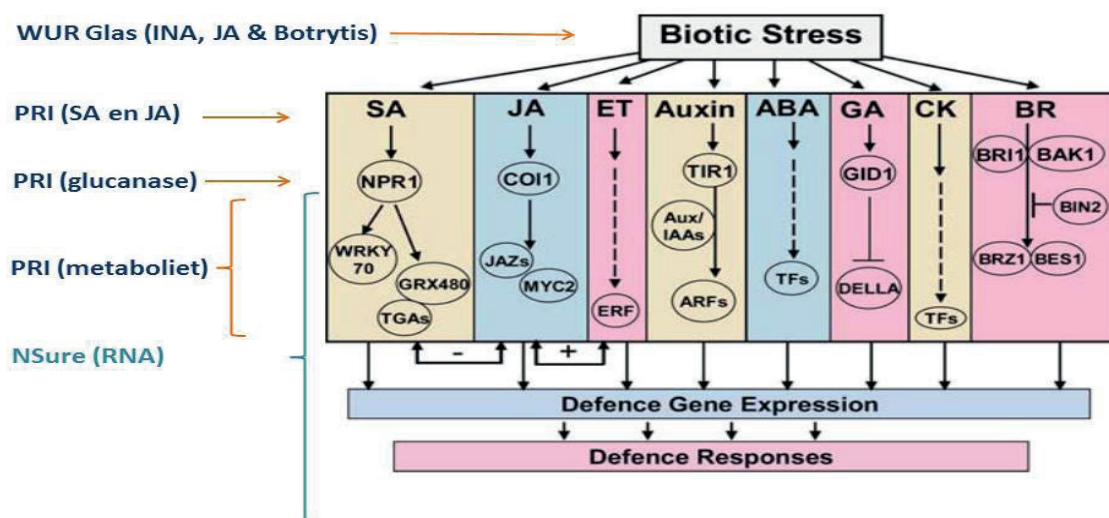


Figuur 1.1 Overzicht van de belangrijkste hormonale afweerreacties in een plant (Pieterse *et al.* 2008).

Het activeren van deze natuurlijke afweerstoffen in een plant voordat een infectie plaatsvindt, wordt het zg. primen genoemd ofwel een plant op scherp zetten. Hierdoor worden natuurlijke afweerstoffen eerder en op een hoger niveau aangemaakt ten opzichte van niet-geactiveerde planten.

Activering van afweerstoffen is mogelijk met chemische activators, zoals salicylzuur of jasmonzuur producten. Bij systemic acquired resistance (SAR) is activatie ook mogelijk door het aanleggen van abiotische stress, bijv. licht. Recent onderzoek laat zien dat de rood:verrood verhoudingen hierbij een belangrijke rol spelen (De Wit, 2012). Maar ook meststoffen (zouten) met oa. fosfaat en calcium (Deliopoulos *et al.* 2010).

Bij de induced systemic resistance (ISR) is het niet- biologisch activeren van de afweerrespons nog niet aangetoond. Wel is bekend dat dosering van hoge CO₂ waardes > 350 ppm de productie van jasmonzuur kan verlagen en hiermee de gevoeligheid voor *Botrytis* stimuleert (Cerrudo *et al.* 2012). Een nadeel van het activeren ISR is dat naast jasmonzuur gelijktijdig ook ethyleen wordt geactiveerd. Dit hormoon speelt een belangrijke rol bij verouderingsprocessen en kan eventueel ongunstig uitpakken ten aanzien van houdbaarheid. In tomaat en *Arabidopsis* is aangetoond dat er een negatieve wisselwerking is tussen de SAR en ISR afweerroute. Maar er zijn ook uitzonderingen op deze regel gevonden, waarbij zelfs een versterkend effect werd aangetroffen. In Figuur 1.2 is een overzicht gegeven van de belangrijkste elementen die betrokken zijn bij de verschillende signaleringsprocessen van planthormonen na inductie door ziekteverwekkers. Tevens zijn de verschillende taken per projectpartner aangegeven.



Figuur 1.2 Overzicht van de belangrijkste elementen die betrokken zijn bij verschillende signaleringsprocessen van plantenhormonen na biotische stress door ziekteverwekkende organismen (schimmels, bacteriën, virussen, insecten). Tevens zijn de verschillende taken per projectpartner aangegeven. Biotische stress veroorzaakt verschillen in plantenhormoon niveaus. Deze verschillen leiden vervolgens weer tot veranderingen in de expressie van afweer gerelateerde genen en activatie van afweerresponsen. Een plus (+) teken geeft een positieve interactie aan, terwijl een min (-) teken een negatieve interactie aangeeft. Afkortingen: ABA, abscisinezuur; ARFs, Auxine response factor; Aux/IAA, Auxine/Indole-azijnzuur; BR, brassinosteroid; BRI1, BR ongevoelig 1; BAK1, BRI1 – gerelateerde kinase1; BIN2, BR ongevoelig 2; BRZ1, brassinazole resistent 1; BES1, BRI1 ems suppressor 1; CK, cytokinine; ERF ethyleen respons factor; ET, ethyleen; GA, gibberelline; GID1, gibberelline ongevoelige dwerg 1; JA, jasmonzuur; SA, salicylzuur; TFs, transcriptie factoren; TIR1, transport remmings respons 1. Bron: Bari & Jones, 2009.

1.4 Plan van Aanpak

Klimaatkasttesten met chemische inducers voor de afweerroutes van SAR en ISR (pilotgewassen tomaat en gerbera).

In twee klimaatkasten zijn achtereenvolgens testen uitgevoerd met pottomaat en eenzelfde serie met potgerbera's (wk 38-41, 2013). Diverse plantweerbaarheidsmetingen zijn eerder uitgevoerd in tomaat, zodat dit een goede referentie vormde voor de gevonden waardes in gerbera. De metingen aan secundaire metabolieten waren echter nieuw zowel voor tomaat als gerbera. Behandelingen met chemische activators zijn lokaal aan één blad van de potplant toegediend (tomaat, derde blad onderaan). Om de SAR afweer te stimuleren is gekozen om INA (2,6-Dichloroisonicotinic acid) toe te dienen. In eerdere proeven gaf deze stof een betrouwbare reactie op de aanmaak van PR eiwitten (zowel glucanasen en chitinasen). Om de ISR afweer te stimuleren is gekozen om jasmonzuur toe te dienen. Deze stof kan echter ook als vluchtige stof afweerprocessen beïnvloeden. Daarom werden de planten behandeld in de uitbloeiruimte en na droging werden de behandelde bladeren ingepakt om beïnvloeding van andere planten en behandelingen in dezelfde klimaatkast te voorkomen (Figuur 1.3).



Figuur 1.3 Om beïnvloeding van de vluchtige stof jasmonzuur naar andere behandelingen te voorkomen werden de behandelde bladeren ingepakt.

1. Botrytisontwikkeling op bladmateriaal en bloemen

In pottomaat en potgerbera werden een aantal bladeren van elke plant een aantal dagen na behandeling met de chemische activators geïnfecteerd met *Botrytis*. De planten werden na besmetting weer teruggeplaatst in de klimaatkasten. Gedurende een periode van twee weken is de *Botrytis* ontwikkeling op de bladeren gemeten. Zie hoofdstuk 2 en 3.

2. Toets voor systemische effecten op ontwikkeling van bloempokken in potgerbera

Van potgerbera's waarvan alleen de bladeren behandeld waren met jasmonzuur of INA kunstmatig zijn vervolgens ook een aantal bloemen besmet met *Botrytis*. Als controlebehandelingen zijn besmette en onbesmette controlebehandelingen meegenomen. Na de besmetting zijn de bloemen in een gesloten plastic doos bij een hoge RV (> 90%) weggezet om de kieming van sporen te bevorderen. Na 48 uur werden de pokken op de lintbloemen gescoord. Zie hoofdstuk 3.

3. Bepalingen van afweerreacties in plantextracten vóór en na infectie.

In de verzamelde plantextracten vóór infectie en 24 uur en 7 dagen na infectie zijn verschillende metingen uitgevoerd door verschillende partijen. Hierbij werd hetzelfde plantextract door alle partijen doorgemeten op de analyse van de verschillende componenten.

a. Specifieke metingen signaalstoffen salicylzuur en jasmonzuur (PRI, Ric de Vos)

Analoog aan RNAseq analyses en globale metabolietprofielering zijn voor een selectie van monsters tevens specifieke metingen aan de signaalstoffen van de immuunsystemen uitgevoerd. In dit geval jasmonzuur als indicator voor ISR en salicylzuur als indicator voor SAR. Zie hoofdstuk 4.

b. Brede screening op secundaire plantmetabolieten (PRI, Ric de Vos)

Doel van dit onderdeel is meer inzicht krijgen in welke inhoudsstoffen beïnvloed worden door INA en JA, en mogelijk een rol spelen bij afweerprocessen van de plant. Hiertoe is een brede screening uitgevoerd op secundaire plantmetabolieten met behulp van globale LCMS-gebaseerde metabolietprofilering ("untargeted metabolomics"). De gebruikte methode is met name gericht op semi-polaire secundaire plantenstoffen zoals fenolen, flavonoïden, alkaloiden en andere metabolieten die bekend staan om hun rol in pathogeenafweer en -resistenties. Bij PRI is veel ervaring met globale LCMS-gebaseerde metabolietprofilering ("untargeted metabolomics"). Deze generieke techniek wordt vanuit hun onderzoek inmiddels toegepast op een brede reeks van verschillende plantensoorten en weefsels. Door middel van specifieke software zijn de ruwe LCMS profielen op een untargeted manier te verwerken tot een grote pieklijst met de relatieve intensiteit van elke gedetecteerde component (reeds bekende en veel nog onbekende inhoudsstoffen) in elk monster. Deze dataset wordt vervolgens gebruikt in statistische analyses zoals principale component analyse (PCA) en Student's t-testen, om te kijken in hoeverre de verschillende behandelingen effecten op het metabolietprofiel van de plant bewerkstelligen en correleren met weerbaarheid, en dus mogelijk bij het afweermechanisme betrokken zijn of als metaboliet-marker voor weerbaarheid gebruikt kunnen worden (analoog aan de genexpressie data). Zie hoofdstuk 4.

c. PR eiwitten, pathogen related proteins (PRI, Luc Stevens)

Binnen het beleidsondersteunend onderzoek heeft PRI enzymactiviteitsmetingen in tomaat ontwikkeld waarmee effecten van behandelingen te testen zijn op het verhogen van de paraatheid van planten bij blootstelling aan biotrofe ziekteverwekkers. Hiervoor zijn twee specifieke eiwitmetingen (glucanase en chitinase) gebruikt die in verschillende testen met oa. rood licht een goede voorspellende waarde geven ten aanzien van activatie van het SAR immuunsysteem. De eiwitmetingen zijn nu alleen gevalideerd voor het gewas tomaat. Omdat beide een vergelijkbare respons gaven is binnen dit onderzoek alleen verder gemeten aan glucanase. Dusver is het niet gelukt deze te valideren voor roos, vermoedelijk vanwege de sterke achtergrond van fenolische stoffen die met de indicatoreiwitten reageren. Maar door deze uit te breiden naar gerbera is het wellicht wel mogelijk om de stap vanuit de vruchtgroente naar sierteelt te zetten. Zie hoofdstuk 5.

d. Genexpressie (NSure)

Het doel binnen dit project is om een breed spectrum van genen te identificeren die betrokken zijn bij afweer en weerbaarheid tegen Botrytis in tomaat en gerbera. Hiervoor is gebruik gemaakt van Next Generation Sequencing en als validatie de qPCR methode. Binnen dit project is het onderzoek eerst uitgevoerd op tomaat en vervolgens is de bruikbaarheid van deze tomaat pathogeen gerelateerde genen na een GO/NO GO getoetst in gerbera. Met deze kennis heeft NSure een indruk gekregen worden hoe generiek de processen zijn die betrokken zijn bij weerbaarheid van de verschillende gewassen. Zie hoofdstuk 6.

2 Ziektetoets met tomaten potplanten

2.1 Doel

Doel van de ziekte-toets met pottomaat was om de effectiviteit te testen van directe behandeling met plantenhormonen op de natuurlijke afweerreactie tegen *Botrytis*. Om van hieruit beter effecten te kunnen voorspellen van abiotische en biotische behandelingen die op vergelijkbare wijze de natuurlijke afweer van planten beïnvloeden. Er is gewerkt met jasmonzuur om de afweer tegen *Botrytis* te stimuleren, maar ook met INA om te testen of er na stimulering van de salicylzuur afweerreactie een tegenstelde werking optreedt en de plant gevoeliger wordt voor infectie.

In de eerste test is gewerkt met het pilotgewas tomaat, omdat *et al.* veel informatie over hormonale afweerreacties en de beïnvloeding daarvan (zg. priming of inductie) daarvan bekend zijn. In de tweede test is gewerkt met gerbera potplanten als pilotgewas voor de sierteelt (Hoofdstuk 3).

2.2 Uitvoering

De klimaatproef met pottomaten (Snackertomaat, van der Lugt) is uitgevoerd in de periode september tot oktober 2013. Er is gekozen om twee plantenhormonen te testen die een grote rol spelen bij geïnduceerde resistentiereacties tegen ziekten. Om de invloed van de aangescherpte afweer tegen biotrofe schimmels te testen is gewerkt met INA (2,6 – Dichloroisonicotinic acid). Deze stof werkt betrouwbaarder dan salicylzuur, maar zet dezelfde SAR reacties in gang (pers.comm. Luc Stevens). De invloed van een aangescherpte afweer tegen necrotrofe schimmels is getest door een behandeling met jasmonzuur uit te voeren. Planten kunnen hierop reageren door ook andere vluchtige stoffen af te scheiden via hun bladeren wat indirect naburige planten kan beïnvloeden als ze in dezelfde ruimte staan. Om deze reden zijn de planten waarvan een blad werd behandeld met jasmonzuur in een andere ruimte behandeld van de overige planten en werden de behandelde bladeren ingehoesd met een plastic zak, zodat indirecte beïnvloeding van vluchtige stoffen in de lucht werd voorkomen. Bij de behandelingen met planthormonen werd één van de onderste bladeren bespoten met een fijne nevel, zodat het blad goed werd bedekt. Deze werd gemarkeerd, zodat deze niet meegenomen werd in het verzamelen van bladmateriaal voor de analyses. De klimaatkastcondities werden gehandhaafd op 18 °C continue en een 85% relatieve luchtvochtigheid.

Om de reactie van de hormoonbehandelingen te bepalen is er op drie tijdstippen bladmateriaal verzameld (drie gepoolde monsters, 4 planten per gepoold monster). Een overzicht van het behandelingschema is te zien in Tabel 2.1. De hormonen werden toegediend en kregen 3 dagen inwerktijd. Op drie verschillende tijdstippen is er bladmateriaal verzameld: voordat de infectie was uitgevoerd (T0), 24 uur na infectie (T1) en een week later (T2). In totaal zijn er 36 planten per behandeling ingezet, zodat op elk tijdstip 12 planten zijn bemonsterd.

Tabel 2.1

Behandelingschema met plantenhormonen in pottomaat.

Behandeling	Concentratie	Tijdstip bladbemonstering
Controle		T0 – voor <i>Botrytis</i> infectie T1 – 24 uur na infectie T2 – 7 dagen na infectie
INA (stimuleert systemic acquired resistance, SAR reactie, tegen biotrofe schimmels)	2 mM, éénmalige bladbespuiting, 3 dagen voor infectie	T0 – voor <i>Botrytis</i> infectie T1 – 24 uur na infectie T2 – 7 dagen na infectie
JA (jasmonzuur, stimuleert induced systemic resistance, ISR reactie, tegen necrotrofe schimmels)	2 mM, éénmalige bladbespuiting, 3 dagen voor infectie	T0 – voor <i>Botrytis</i> infectie T1 – 24 uur na infectie T2 – 7 dagen na infectie

Om een succesvolle infectie van *Botrytis* in bladmateriaal te stimuleren is de aanwezigheid van wondweefsel of afstervend bladmateriaal noodzakelijk. Daarom werd een gat in het blad aangebracht voorafgaand aan de *Botrytis* besmetting (1.10^5 sporen/ml). Hiervoor werden twee bladstelen onderin de plant geselecteerd die niet met het plantenhormoon waren behandeld. Op elke bladsteel werden twee gaten aangebracht. Deze geïnfecteerde bladeren werden niet meegenomen in het verzamelen van bladmateriaal voor de analyses. De ontwikkeling van de lesiegroei werd opgemeten in cm's (breedte en lengte van de lesie) en hiervan werd een oppervlakte berekend.

2.3 Resultaten

De *Botrytis* infectie was goed geslaagd. Binnen enkele dagen was de eerste doorgroei vanuit de aangebrachte wondvlakken zichtbaar (Figuur 2.1).



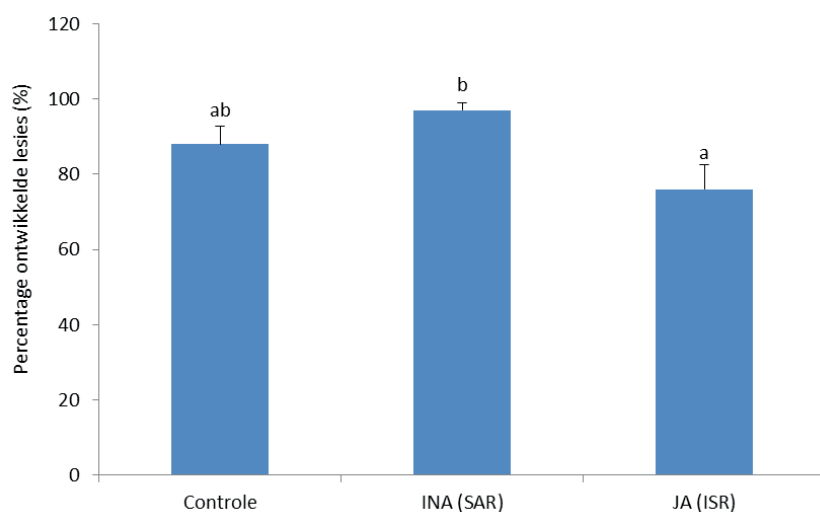
Figuur 2.1 Tomatenplant met *Botrytis* infectie.

Drie weken na de infectie waren er ook duidelijke verschillen tussen de planten waar te nemen (Figuur 2.2). Planten behandeld met jasmonzuur bleven compact van vorm. De INA behandelde planten leken meer strekking te vertonen ten opzichte van planten die met jasmonzuur zijn behandeld en voor te lopen in de productie van vruchten.



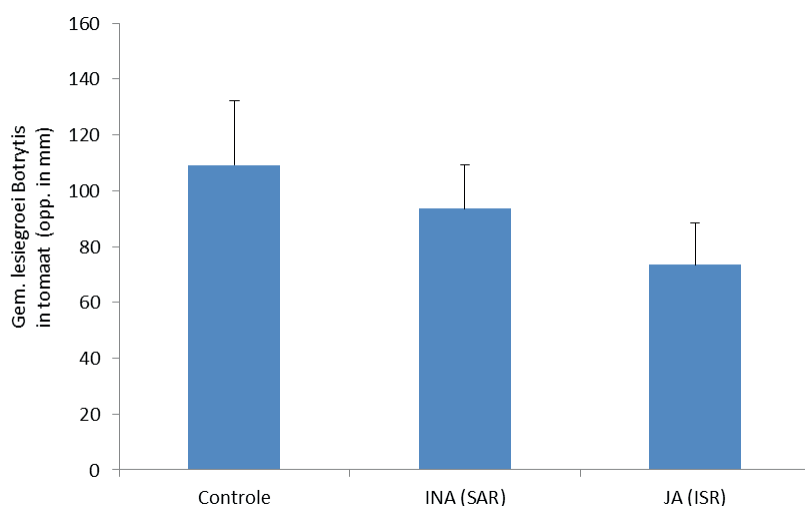
Figuur 2.2 Foto van de *Botrytis* infectie drie weken na de behandeling met plantenhormonen. Per behandeling zijn twee planten neergezet: JA (blauwe etiketten), INA (groene etiketten), Controle (gele etiketten).

Bij het scoren van de ontwikkeling van Botrytis viel het op dat niet alle wondvlakken even goed waren uitgegroeid. In Figuur 2.3 is te zien dat jasmonzuur behandelde planten minder wondvlakken hadden die waren uitgegroeid dan de INA behandelde planten. De INA behandelde planten lijken ook meer ontwikkelde lesies te vertonen ten opzicht van de controleplanten.



Figuur 2.3 Percentage ontwikkelde lesies na behandeling met plantenhormonen in pottomaat. De kolommen geven de gemiddeldes weer plus de standaardfout. Verschillende letters geven betrouwbare verschillen aan tussen behandelingen (Tukey's test, $P < 0,05$).

Bij de gemiddelde grootte van de lesieontwikkeling is te zien dat planten na een jasmonzuurbehandeling een tragere ontwikkeling (ca. 40%) van Botrytis ondervinden ten opzichte van de andere behandelingen (Figuur 2.4).



Figuur 2.4 Gemiddelde lesiegroei van Botrytis in pottomaat na behandeling met plantenhormonen in pottomaat. De kolommen geven de gemiddeldes weer plus de standaardfout. Verschillende letters geven betrouwbare verschillen aan tussen behandelingen (Tukey's test, $P < 0,05$).

2.4 Conclusies

Pottomaten die lokaal zijn behandeld met het plantenhormoon jasmonzuur vertonen een tragere ontwikkeling van Botrytis op niet behandelde bladdelen. De werking van INA in pottomaat lijkt de gevoeligheid voor Botrytis te stimuleren en daarnaast de plantenmorfologie te beïnvloeden door meer strekking van de bladstelen. Deze biotoets bevestigt een systemische en tegengestelde werking van beide plantenhormonen.

3 Ziektetoets met gerbera potplanten

3.1 Doel

Doel van de ziekte-toets met *Botrytis* in potgerbera was om te testen of de behandeling met plantenhormonen in een snijbloemengewas (pilotgewas: gerbera) overeenkomt met die in vruchtgroentegewas (pilotgewas: tomaat) waar meer fundamentele kennis over plantafweerreacties beschikbaar is. Daarnaast is getoetst of de systemische werking van een bladbehandeling ook doorwerkt naar de bloemen.

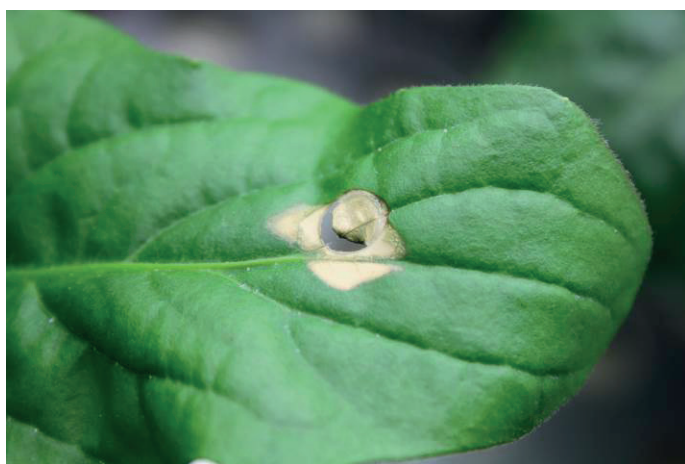
3.2 Uitvoering

De uitvoering van de klimaatkasttest met potgerbera (geleverd via Beekenkamp Plants, Takii) verliep op gelijke wijze als de ziekte-toets met tomatenplanten (paragraaf 3.2). Alleen werden in deze test ook bloemen op gevoeligheid voor *Botrytis* onderzocht. Drie dagen na behandeling met de plantenhormonen werden de bloemen geoogst, in gesloten bakken met water geplaatst (12 bloemen per behandeling) en besmet met *Botrytis* (1.105 sporen/ml). Na 48 uur werden de lintbloemen gescoord op het aantal bruingekleurde lesies per 1mm². Voor de uitvoering van de proef was het lastig om in het najaar nog aan jong en goed plantmateriaal te komen. Via Beekenkamp Plants zijn potgerbera's beschikbaar gesteld waar al wel een lichte besmetting van *Botrytis* onderin het gewas en op de bloemen aanwezig was. Voordat de proef werd ingezet is er een strenge selectie geweest om planten met de minste infectie te plaatsen en planten met lichtgekleurde bloemen, zodat hierop de lesies goed zijn te scoren.

3.3 Resultaten

3.3.1 Ziekteontwikkeling op de bladeren

De lesieontwikkeling van *Botrytis* op de bladeren van gerbera bleef zeer beperkt in vergelijking met die op de tomatenplanten (Figuur 3.1). Zelfs nadat de klimaatkastcondities continue op 90% waren gezet om de luchtvochtigheid verder te verhogen. Er waren geen verschillen tussen behandelingen aanwezig.



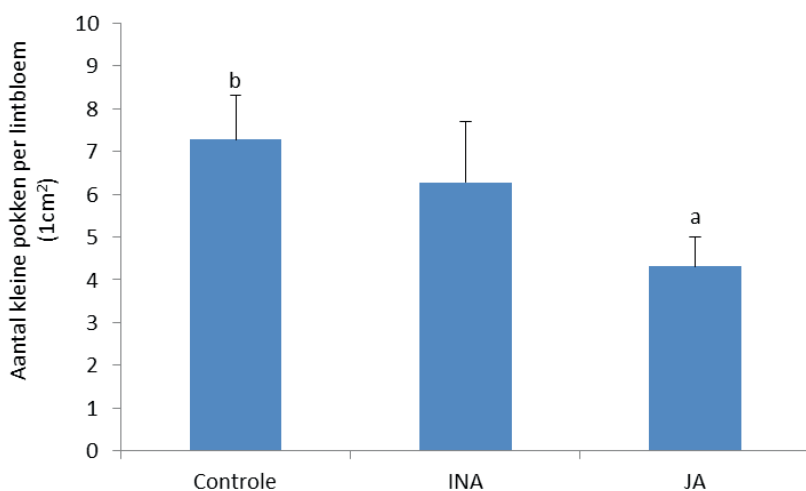
Figuur 3.1 Ontwikkeling van *Botrytis* in gerberablاد.

3.3.2 Ziekteontwikkeling op de bloemen

Bij het scoren van het aantal lesies op de lintbloemen van gerbera was er naast de kunstmatige besmetting sprake van een natuurlijke besmetting. Desondanks waren de sporen die waren aangebracht met de kunstmatige besmetting goed ontwikkeld (Figuur 3.2). De verschillen tussen behandelingen waren duidelijk meetbaar. Bij de bloemen die afkomstig waren van planten die waren behandeld met jasmonzuur zijn ongeveer 50% minder lesies geteld dan in de controlebehandeling (Figuur 3.3). De INA-behandeling geeft geen sterkere ontwikkeling van lesies ten opzichte van de controlebehandeling.



Figuur 3.2 Gerberabloem met zichtbare *Botrytis* lesies.



Figuur 3.3 Aantal lesies op de lintbloemen van gerbera na behandeling van een blad met een plantenhormoon. INA stimuleert de afweerroute tegen meeldauw, en JA, jasmonzuur, de afweerroute tegen *Botrytis*. De kolommen geven de gemiddeldes weer plus de standaardfout. Verschillende letters geven betrouwbare verschillen aan tussen behandelingen (Tukey's test, $P < 0,05$).

3.4 Conclusies

De gevoeligheid voor *Botrytis* van individueel besmette bladeren van de getoetste potgerbera lijkt een stuk lager te liggen in vergelijking met pottomaat. Er werden hierdoor geen verschillen gevonden in de ziekteontwikkeling op de bladeren tussen een behandeling met jasmonzuur of INA. Behandeling van groene bladdelen met jasmonzuur werkte wel systemisch door in een verminderde gevoeligheid van de bloemen voor *Botrytis*.

4 Specifieke meting van signaalstoffen en brede metaboliëprofilering

4.1 Doel

Deze deelstudie van het project was gericht op zowel specifieke metingen van signaalstoffen van systemische afweerreacties (salicylzuur en jasmonzuur), als een brede metaboliëprofilering om meer zicht te krijgen op andere inhoudsstoffen die een rol kunnen spelen bij afweerprocessen, hetzij direct hetzij via de signaalstoffen.

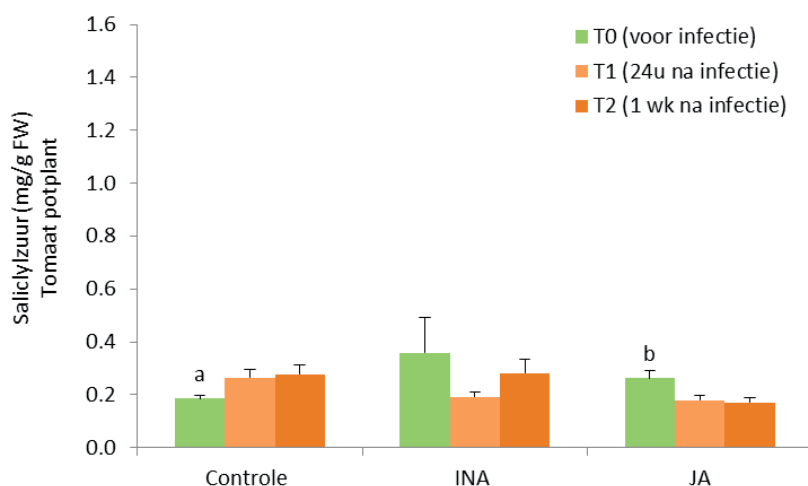
4.2 Aanpak

Voor een selectie van de monsters zijn specifieke, kwantitatieve metingen aan jasmonzuur, als indicator voor ISR, en salicylzuur, als indicator voor SAR, uitgevoerd. Bij de brede screening van secundaire plantmetaboliëten is gebruik gemaakt van globale metaboliëprofilering ("untargeted metabolomics") met behulp van LCMS (vloeistofchromatografie gekoppeld aan massaspectrometrie). Deze LCMS methode is met name gericht op detectie van semi-polaire secundaire metaboliëten zoals fenolen, flavonoïden, alkaloiden en andere stoffen die bekend staan om hun rol in pathogeenresistenties. Door middel van specifieke software zijn de ruwe LCMS profielen op een untargeted manier verwerkt tot lange piekl ijsten met de relatieve intensiteit van elke gedetecteerde component. Deze data zijn vervolgens gebruikt in een multivariate analyse (GeneMaths software) en univariate analyses (Student's T-testen in Excel) om te kijken in hoeverre de verschillende behandelingen effecten op het metaboliëprofiel van de plant hebben bewerkstelligd.

4.3 Gerichte screening SA en JA

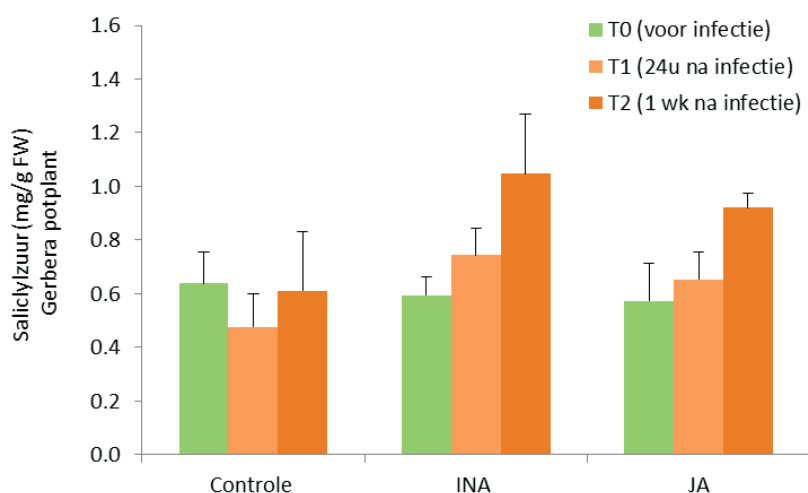
Het gehalte van salicylzuur in de controleplanten was hoger in gerbera dan in tomaat (vergelijk Figuur 4.1 met 4.2). Verschillen in absolute waarden tussen plantensoorten is echter geen goede maat voor eventuele verschillen in weerbaarheid, omdat elke plant andere vormen van salicylzuur kan ophopen (zogenaamde conjugaten). Belangrijker is de reactie van de specifieke plantensoort of cultivar op behandelingen en besmetting.

In de gehalten van salicylzuur bij tomaat zijn er geen verschillen aanwezig tussen inductiebehandelingen na infectie. Behandeling met jasmonzuur geeft een kleine maar significante toename vóór infectie. Daarnaast is uit de literatuur bekend dat een behandeling met INA niet leidt tot een verhoogde productie van salicylzuur, maar dat er desondanks wel een systemische afweerreactie wordt geactiveerd met de bijbehorende verhoging van afweerei witten (Zie hoofdstuk 5).



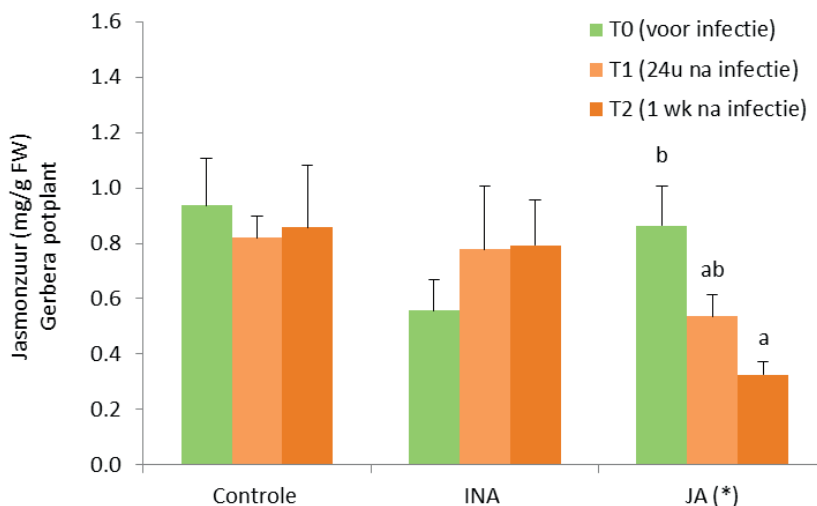
Figuur 4.1 Salicylzuurgehalten in tomaat na behandeling met INA (SAR inductie) of jasmonzuur (ISR inductie) op drie verschillende tijdstippen: voor infectie (T0) en 24 uur (T1) of 1 week na infectie (T2). De kolommen geven de gemiddeldes weer plus de standaardfout van 3 gepoolde monsters van 4 elk planten. Verschillende letters geven betrouwbare verschillen aan tussen behandelingen (gepaarde T-test, $P < 0,05$).

Bij gerbera bladeren waren er geen meetbare effecten van INA of JA op het salicylzuur gehalte. Wel zijn de niveaus van salicylzuur binnen de planten die met INA of jasmonzuur zijn behandeld significant verhoogd na besmetting met Botrytis.



Figuur 4.2 Salicylzuur in gerbera na behandeling met INA (SAR inductie) of jasmonzuur (JA) op drie verschillende tijdstippen: voor infectie (T0) en 24 uur (T1) of 1 week na infectie (T2). De kolommen geven de gemiddeldes weer plus de standaardfout van 3 gepoolde monsters van 4 elk planten. Bij INA en JA is salicylzuur na 1 week verhoogd ten opzichte van T0 (Gepaarde T-test, $P < 0.05$).

De niveaus van jasmonzuur in tomaat waren zo laag dat deze onder de detectiegrens van de gebruikte analysetechniek vielen, vandaar dat deze grafiek ontbreekt. Bij de gerbera bladeren zijn wel meetbare niveaus van jasmonzuur teruggevonden met daarin enkele significante verschillen (Figuur 4.3). De jasmonzuurgehaltes vóór infectie (T0) waren niet significant verschillend tussen de behandelingen, ook niet bij JA-voorbehandeling. Infectie van gerbera met Botrytis resulteerde in een significante verlaging van het niveau van jasmonzuur alleen in de planten die vooraf behandeld waren met jasmonzuur: al na één dag (T1) is het niveau sterk gedaald.



Figuur 4.3 Jasmonzuur in gerberablade na behandeling met INA (SAR-inductie) of jasmonzuur (JA; ISR-inductie) op drie verschillende tijdstippen: vóór infectie (T0) en 24 uur (T1) of 1 week na infectie (T2). De kolommen geven de gemiddeldes weer plus de standaardfout van 3 gepoolde monsters van 4 planten. Verschillende letters geven betrouwbare verschillen aan tussen behandelingen (Tukey's test, $P < 0,05$). (*) bij de behandeling geeft een betrouwbare verlaging aan over alle tijdstippen van de JA-behandeling ten opzichte van de controlebehandeling (Tukey's test, $P < 0,05$).

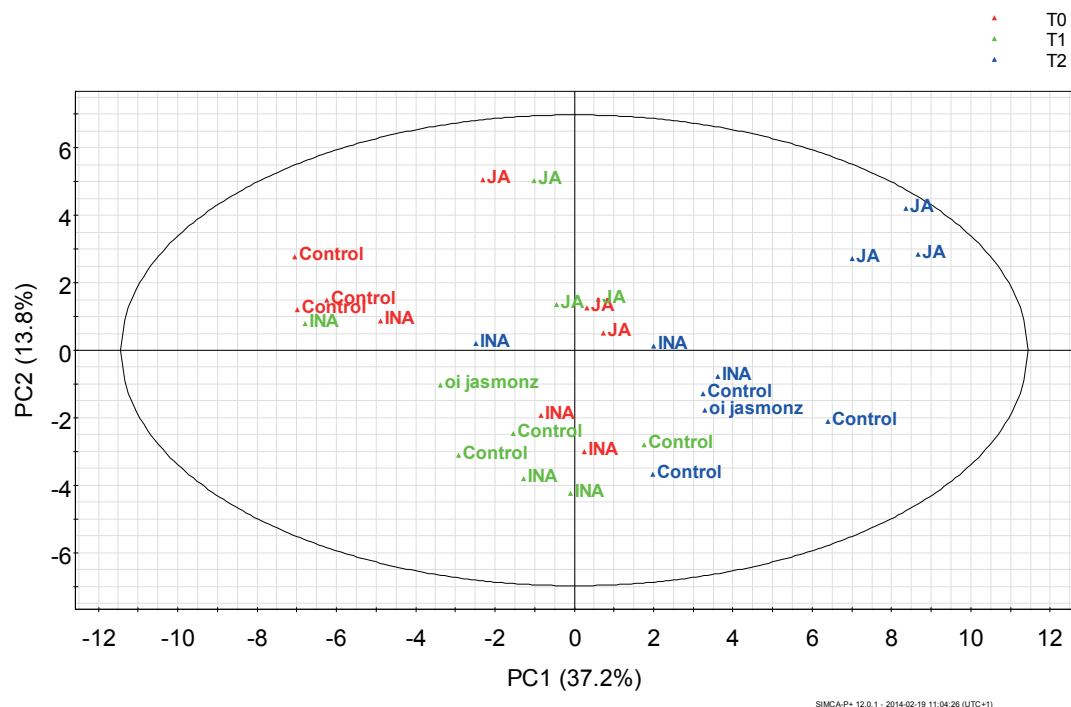
4.4 Brede screening metabolieten

Met behulp van de untargeted metabolomics methode konden in de extracten van het blad van tomaat in totaal 220 metabolieten worden gedetecteerd, en in die van gerbera 326.

Figuur 4.4 toont het resultaat van een multivariate analysetechniek, te weten Principale Component Analyse (PCA), op de tomatenmonsters om de globale verschillen en overeenkomsten tussen de monsters, gebaseerd op hun variatie in de relatieve hoeveelheid van alle 220 metabolieten, te visualiseren. De meest belangrijke factor bij de gemeten verschillen tussen de monsters (PC1, X-as: 37.2% van de totale variatie) komt overeen met de tijd van Botrytis-infectie. Het voorbehandelingseffect, de rode codes, van jasmonzuur (JA) geeft ten opzichte van de onbehandelde (Control) planten een duidelijke verschuiving van het metabolietprofiel over de X-as, in dezelfde richting als de infectie. Dit resultaat kan opgevat worden als een priming-effect: de plant heeft als het ware zijn afweerreactie (gemeten als metabolietprofiel) tegen Botrytis alvast opgeschreefd. De 3 INA-voorbehandelingsmonsters liggen relatief ver uit elkaar, hetgeen duidt op relatief grote variatie tussen de 3 monsters, waardoor het voorbehandelingseffect met INA minder duidelijk tot uiting komt. Na infectie verschuiven de profielen van alle monsters in dezelfde richting over de X-as (infectie-tijd), waarbij op T2 de JA-behandelde monsters opnieuw een aparte groep vormen (dus een ander metabolietprofiel hebben) ten opzichte van de controle en INA-behandelde monsters.

Met behulp van een univariate statistiekmethode (Student T-test; $n=3$, significantiegrens $\alpha = 0.05$) is vervolgens gekeken welke metabolieten een significant verschil vertonen tussen de verschillende behandelingen en in de tijd van infectie, en in welke verhouding ze aanwezig zijn in de verschillende bladmonsters, voor zowel tomaat als gerbera. In paragrafen hieronder is een overzicht gegeven van de aantallen metabolieten die significante niveauverschillen laten zien. In de figuren is een selectie gemaakt van metabolieten die hierbij de grootste verschillen vertoonden. Bepaalde geselecteerde metabolieten zijn mogelijk betrokken bij de weerbaarheid van de planten tegen Botrytis en kunnen daarmee fungeren als markers. Van de meeste bladmetabolieten die met deze globale screening konden worden aangewezen als differentieel tussen behandelingen of infecties, is de chemische structuur echter nog geheel onbekend (metaboliet nog nooit eerder beschreven in literatuur) of nog onduidelijk, met name in het weinig bestudeerde siergewas gerbera. Omdat verdere identificatie van de (vele) significant verschillende stoffen buiten het gereserveerde budget voor dit projectonderdeel viel, aangezien bekend was dat dit extra analyses en relatief veel tijd zou vergen, wordt bij de bespreking van de resultaten van dit onderdeel gebruik gemaakt van alleen de metabolietnummers. De nummers van de metabolieten zeggen verder niets over belangrijkheid of functie in de plant, en gelijke nummers zijn niet per definitie dezelfde metabolieten in gerbera en tomaat.

Wij adviseren altijd om bij een dergelijke globale metabolietscreening eerst de kandidaat markers te verifiëren en te testen op robuustheid in een vervollexperiment, vóórdat er tijd en budget gestoken wordt in identificatie van markers die achteraf niet reproduceerbaar blijken te zijn



Figuur 4.4 *Principale Component Analyse (PCA) van de tomatenbladmonsters gebaseerd op de variatie in de relatieve hoeveelheid van 220 metabolieten gedetecteerd met behulp van untargeted LCMS-gebaseerde metaboliet profilering. Rood: T0 (vóór infectie); groen: T1 (24u na infectie); blauw: T2 (7 dagen na infectie).*

4.4.1 Invloed van infectie

Bij het vergelijken van inhoudsstoffen met behulp van statistische analyses (T-test; $n=3$) vóór en na infectie zien we bij zowel tomaat als gerbera dat er veel veranderingen optreden bij meer dan 90 metabolieten, zowel positief (toename) als negatief (afname), zie Tabel 4.1. Infectie van onbehandelde tomaat resulteerde in een significante verandering van maar liefst 43% van alle detecteerbare tomatenbladmetabolieten (94 van de 220); in gerbera is dit percentage 29% (93 van de 326 metabolieten). In Figuur 4.4 zijn 10 van de 16 tomatenbladmetabolieten weergegeven die minimaal 3 x hoger aanwezig waren na infectie.

Tabel 4.1

Overzicht van totaal aantal metabolieten die een significant verschil geven in vergelijkingen tussen onbesmet en besmet plantmateriaal en de effecten na toediening van een chemische activator (T-test, $P < 0.05$). INA: 2,6 – Dichloroisonicotinic acid; JA: jasmonic acid; T0 (voor infectie), T1 (24 uur na infectie), T2 (7 dagen na infectie).

	Tomaat	Gerbera
Onbesmet vs besmet:		
Controle T0-T1	94	93
Controle T0-T2	90	62
INA T0-T1	34	21
INA T0-T2	55	24
JA T0-T1	26	13
JA T0-T2	82	25
Behandelingseffect tov Controle		
INA T0-Control T0	42	82
INA T1-Control T1	7	18
INA T2-Control T2	38	9
JA T0-Control T0	62	44
JA T1-Control T1	69	22
JA T2-Control T2	33	7

4.4.1.1 Tomaat

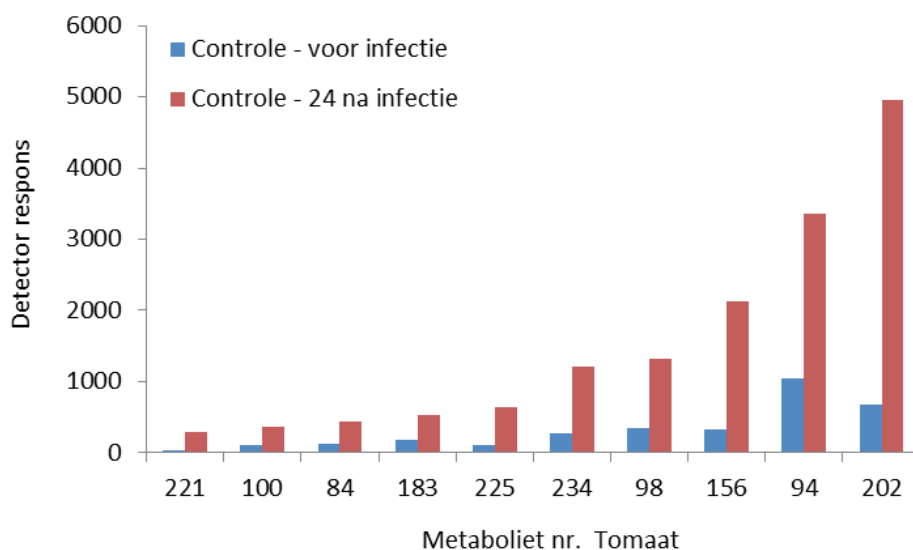
Bij het analyseren van de metabolietpatronen is een onderscheid te maken in de mate waarin een stof wordt verhoogd of verlaagd. Tabel 4.2 geeft een uitsplitsing van het aantal metabolieten in tomaat die een sterke toe- of afname laten zien na een bepaalde tijd van kunstmatige infectie.

Tabel 4.2

Productieverschillen van metabolieten in alle behandelingen bij tomaat die specifiek reageren op een besmetting met Botrytis. T0 (voor infectie), T1 (24 uur na infectie), T2 (7 dagen na infectie). Daarbij is onderscheid gemaakt of de productie van de metaboliet verhoogd (laag à hoog) wordt na infectie of verlaagd (hoog à laag).

Tomaat	verschil > 2x	verschil > 4x	verschil > 10 x
Controle TO (laag) Controle T1 (hoog)	73	27	6
Controle TO (hoog) Controle T1 (laag)	6	2	1
Controle TO (laag) Controle T2 (hoog)	101	43	19
Controle TO (hoog) Controle T2 (laag)	7	3	0
JA TO (laag) JA T1 (hoog)	13	2	1
JA TO (hoog) JA T1 (laag)	11	3	0
JA TO (laag) JA T2 (hoog)	66	27	10
JA TO (hoog) JA T2 (laag)	12	3	1
INA TO (laag) INA T1 (hoog)	17	3	1
INA TO (hoog) INA T1 (laag)	12	3	1
INA TO (laag) INA T2 (hoog)	41	15	5
INA TO (hoog) INA T2 (laag)	15	5	1

In Figuur 4.4 zijn 10 van de 16 metabolieten in tomaat weergegeven die 3 x hoger (en significant) aanwezig waren in het plantenextract na infectie.



Figuur 4.4 Een selectie van 10 metabolieten in tomaat met een significant verschil in de controlebehandelingen tussen het tijdstip voor infectie en 24 uur na besmetting. Van de 94 metabolieten die een betrouwbaar verschil geven zijn er 16 die een 3-voudig hoger verschil in detector respons geven tussen T0 en T1.

4.4.1.2 Gerbera

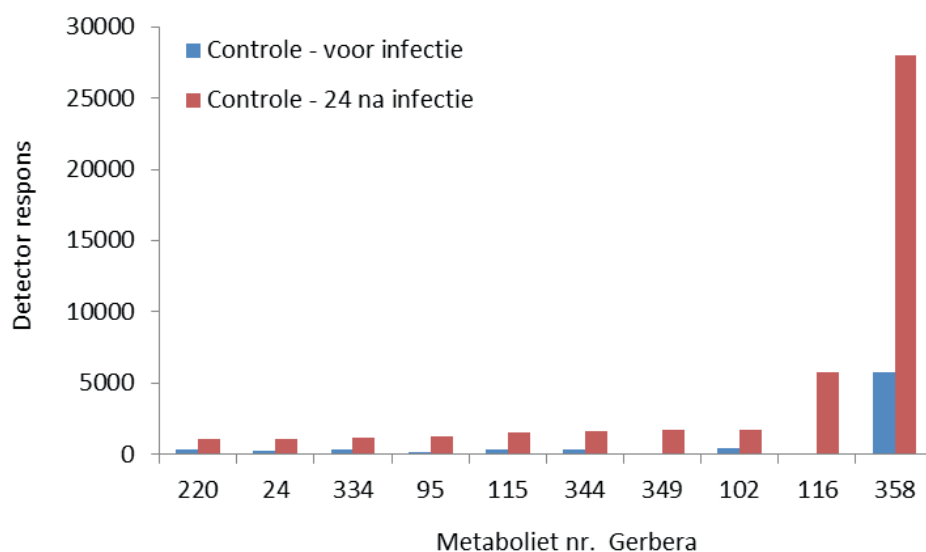
Bij het analyseren van de metabolietpatronen is een onderscheid te maken in de mate waarin een stof wordt verhoogd of verlaagd. Tabel 4.3 geeft een uitsplitsing van het aantal metabolieten in gerbera die een sterke toe- of afname laten zien na een bepaalde tijd van kunstmatige infectie.

Tabel 4.3

Productieverschillen van metabolieten in alle behandelingen bij tomaat die specifiek reageren op een besmetting met Botrytis. T0 (voor infectie), T1 (24 uur na infectie), T2 (7 dagen na infectie). Daarbij is onderscheid gemaakt of de productie van de metaboliet verhoogd (laag à hoog) wordt na infectie of verlaagd (hoog à laag).

Gerbera	verschil > 2x	verschil > 4x	verschil > 10 x
Controle TO (laag) Controle T1 (hoog)	126	80	43
Controle TO (hoog) Controle T1 (laag)	68	39	14
Controle TO (laag) Controle T2 (hoog)	147	106	70
Controle TO (hoog) Controle T2 (laag)	51	25	5
JA TO (laag) JA T1 (hoog)	47	20	9
JA TO (hoog) JA T1 (laag)	26	8	0
JA TO (laag) JA T2 (hoog)	71	31	14
JA TO (hoog) JA T2 (laag)	20	3	0
INA TO (laag) INA T1 (hoog)	25	4	1
INA TO (hoog) INA T1 (laag)	41	12	4
INA TO (laag) INA T2 (hoog)	31	7	1
INA TO (hoog) INA T2 (laag)	49	10	3

In Figuur 4.5 zijn 10 van de 48 metabolieten in gerbera weergegeven die 3 x hoger aanwezig waren in het plantenextract na infectie.



Figuur 4.5 Een selectie van 10 metabolieten in gerbera met een significant verschil in de controlebehandelingen tussen het tijdstip voor infectie en 24 uur na besmetting. Van de 93 metabolieten die een betrouwbaar verschil geven zijn er 48 die een 3-voudig hoger verschil in detector respons geven tussen T0 en T1.

4.4.2 Specifieke effecten van jasmonzuur

Naast de algemene reactie op Botrytis infectie in de controlebehandelingen is er gekeken naar de effecten van jasmonzuur op veranderingen in metabolietniveaus (Figuur 4.6 en 4.7). Om gerichte primingseffecten tegen Botrytis op te sporen is hierbij een selectie gemaakt van stoffen die bij de jasmonzuur behandeling een significant positief effect lieten zien ten opzichte van zowel de controlebehandeling als de behandeling met INA. Er is verder een onderscheid gemaakt tussen een snelle respons binnen 24 uur (T1) en een late respons na 7 dagen (T2). Er was bij zowel tomaat als gerbera 1 stof die op zowel T1 als T2 een onderscheidend effect lieten zien: in tomaat was dit metaboliet nr. 159, en bij gerbera nr. 274.

4.4.2.1 Tomaat

In Tabel 4.4 is een overzicht gegeven van productieveverschillen bij de metabolieten die gemeten zijn bij tomaat in reactie op de behandeling met jasmonzuur.

Tabel 4.4

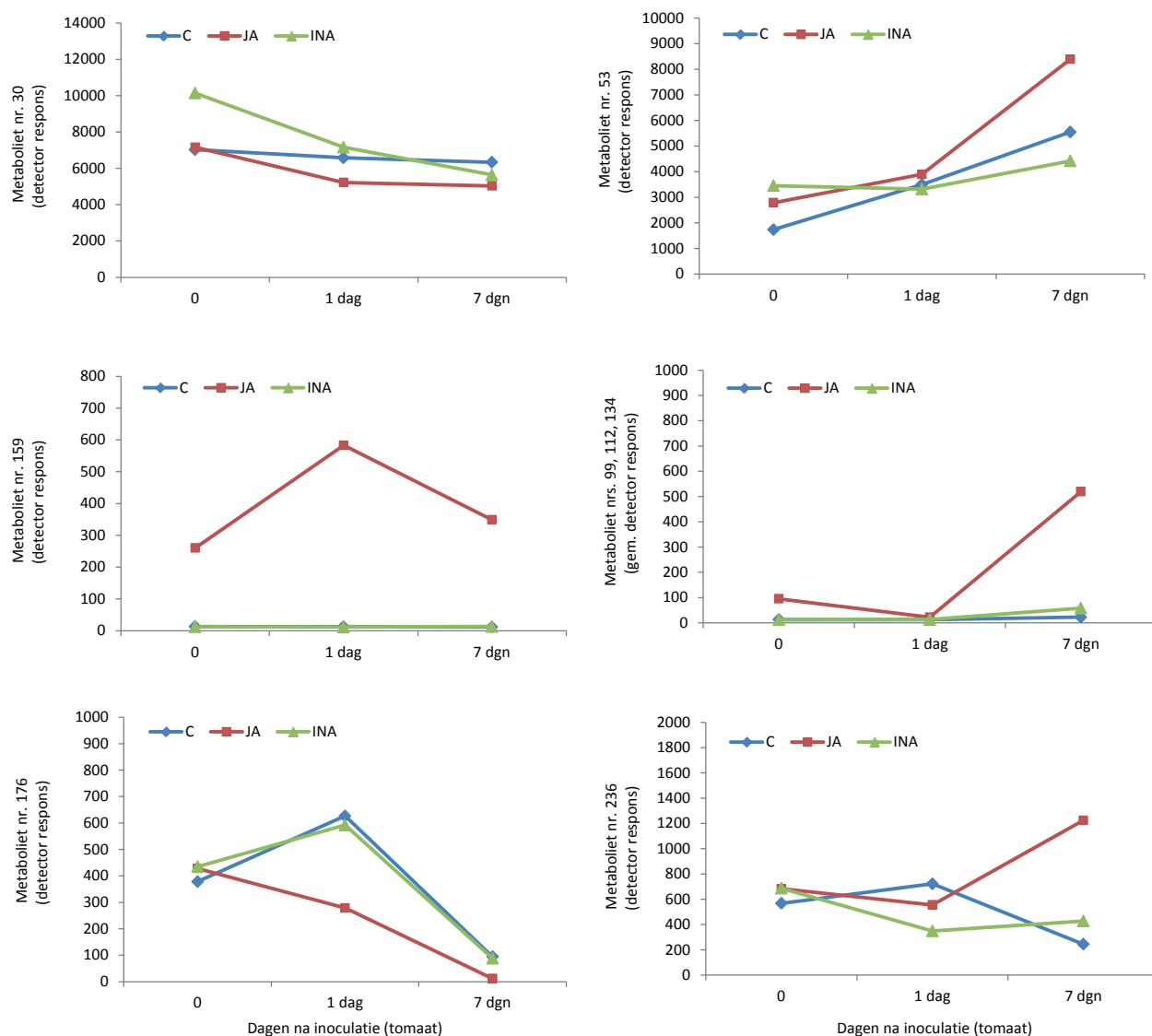
Productieverschillen van metabolieten in tomaat die specifiek reageren na een behandeling met jasmonzuur in vergelijking met de onbehandelde controle behandelingen. T0 (voor infectie), T1 (24 uur na infectie), T2 (7 dagen na infectie).

Tomaat	Verschil > 2x	Verschil > 4x	Verschil > 10x
Controle T0 (laag) JA T0 (hoog)	63	34	13
Controle T0 (hoog) JA T0 (laag)	4	1	1
Controle T1 (laag) JA T1 (hoog)	19	13	6
Controle T1 (hoog) JA T1 (laag)	14	1	0
Controle T2 (laag) JA T2 (hoog)	31	18	9
Controle T2 (hoog) JA T2 (laag)	14	7	1

Bij tomaat (Figuur 4.6) gaven metabolietnummers 30, 159 en 176 een specifieke jasmonzuur respons binnen 24 uur (T1), terwijl nummers 53, 99, 112, 134 en 236 een respons vertoonden na 7 dagen (T2). Deze responsen zijn significant verschillend ten opzichte van de controlebehandeling en de behandeling met salicylzuur (Figuur 4.6). Behalve van nummer 53, is de identiteit van de meeste van deze stoffen is vooralsnog onbekend, maar deze kunnen, indien gewenst, in een vervolgproject nader gekarakteriseerd worden met behulp van additionele LCMS experimenten.

Metabolietnummer 53: Caffeïnezuur

Tomatenbladmetabolietnummer 53 was een reeds bekende stof uit eerder onderzoek van PRI aan tomatenvrucht: 3-caffeoylquinic acid, een speciale caffeïnezuur-conjugaat vergelijkbaar met zijn meer bekendere isomeer chlorogeenzuur (=5-O-caffeoylquinic acid) dat veel aanwezig is in tomatenblad. Caffeïnezuur is een enkelvoudige fenolverbinding. Het is bekend dat fenolische verbindingen toxisch zijn voor ziekteverwekkers en na infectie op hoger niveau en sneller aanwezig zijn in resistente cultivars ten opzichte van gevoelige cultivars. In perzik is chlorogeenzuur bijvoorbeeld in hoge mate aanwezig in resistente cultivars, zowel in onrijp als rijp fruit, die resistentie vertonen tegen *Monilinia* vruchtrot. Resistentie in perzik door caffeïnezuur komt niet zozeer voort uit zijn giftigheid tegen de schimmel, maar met name uit remming van enzymen die de schimmel uitscheidt om plantenweefsel te verteren.



Figuur 4.6 Overzicht van metabolieten in tomaat met een significante korte of langere responstijd op jasmonzuur na besmetting met *Botrytis* en ten opzichte van de controlebehandeling en de INA behandeling.

4.4.2.2 Gerbera

In Tabel 4.5 is een overzicht gegeven van productieverschillen bij de metabolieten die gemeten zijn bij tomaat in reactie op de behandeling met jasmonzuur.

Tabel 4.5

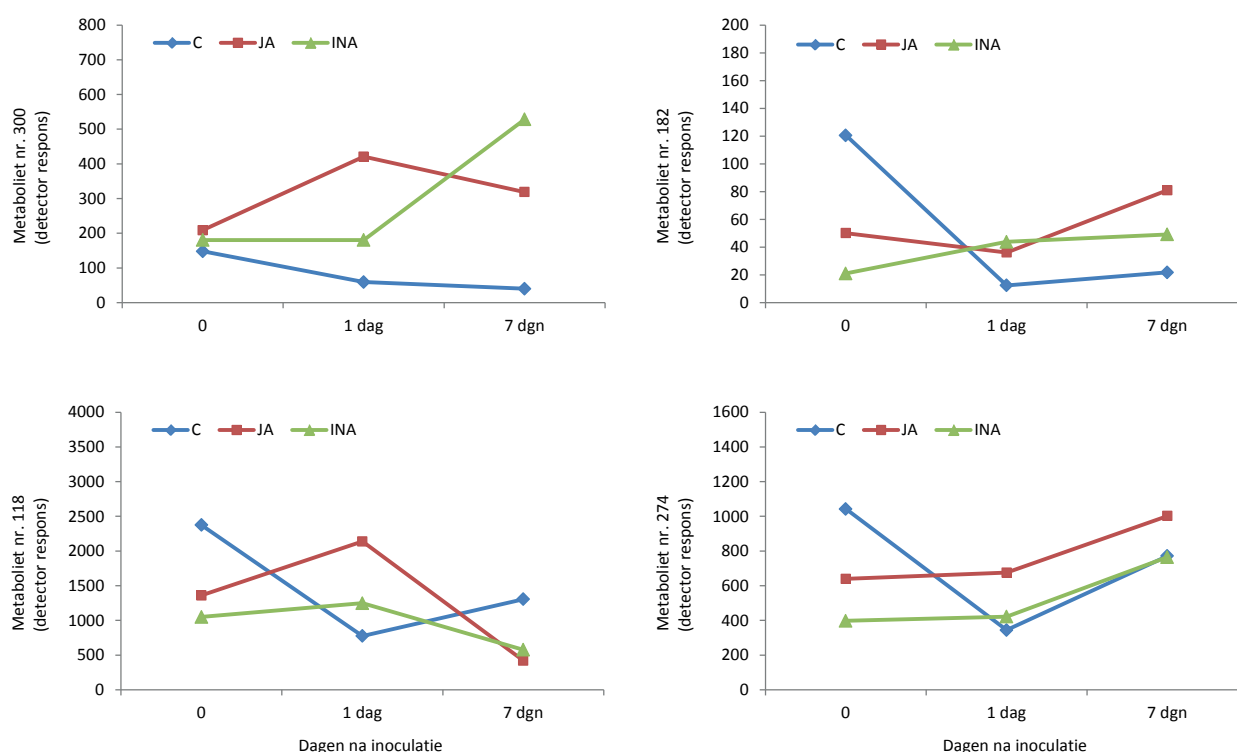
Productieverschillen van metabolieten in gerbera die specifiek reageren na een behandeling met jasmonzuur in vergelijking met de controle behandelingen. T0 (voor infectie), T1 (24 uur na infectie), T2 (7 dagen na infectie).

Gerbera	Verschil > 2x	Verschil > 4x	Verschil > 10x
Controle T0 (laag) JA T0 (hoog)	117	67	20
Controle T0 (hoog) JA T0 (laag)	41	6	4
Controle T1 (laag) JA T1 (hoog)	68	27	11
Controle T1 (hoog) JA T1 (laag)	38	19	5
Controle T2 (laag) JA T2 (hoog)	38	14	10
Controle T2 (hoog) JA T2 (laag)	44	15	2

Bij gerbera geven na behandeling met jasmonzuur de volgende metabolieten een korte specifieke respons binnen 24 uur: nr. 118, nr. 300.

Bij gerbera geven na behandeling met jasmonzuur de volgende metabolieten een lange respons binnen 7 dagen: nr. 182, nr. 274.

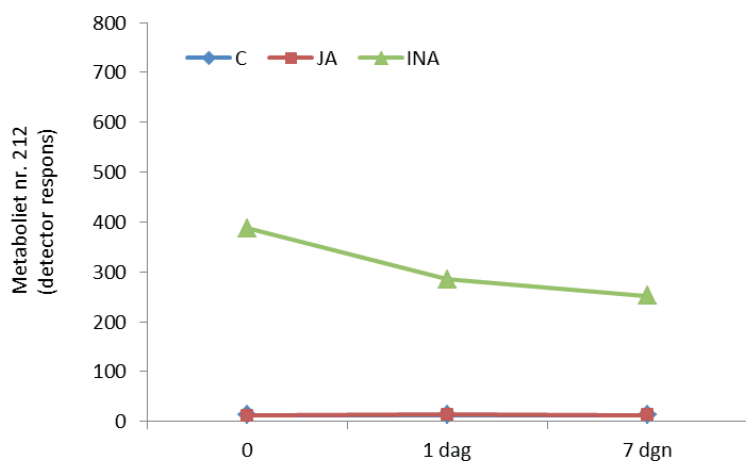
Deze responsen zijn significant verschillend ten opzichte van de controlebehandeling en de behandeling met salicylzuur (Figuur 4.7).



Figuur 4.7 Voorbeelden van metabolieten in gerbera met een significante korte (1 dag) of langere responstijd (7 dagen) op jasmonzuur na besmetting met *Botrytis* en ten opzichte van de controlebehandeling en de INA behandeling.

4.4.3 Specifieke invloed van INA

In tomaat, was in de metabolietanalyses de behandeling met INA (2,6 – Dichloroisonicotinic acid) goed terug te zien (nr. 212). Figuur 4.8 laat zien dat deze stof binnen drie dagen al goed door de plant is opgenomen bij de planten die met INA zijn behandeld. INA was (zoals verwacht) niet detecteerbaar bij de onbehandelde controleplanten en de planten die met jasmonzuur zijn behandeld blijven.



Figuur 4.8 Opname van INA (2,6 – Dichloroisonicotinic acid, nr.212) in pottomaat is binnen drie dagen (T0) terug te meten.

4.4.3.1 Tomaat

In totaal waren 42 van de 220 tomatenbladmetabolieten significant veranderd door voorbehandeling met INA; een aantal stoffen waren niet detecteerbaar in controle-T0 maar wel duidelijk detecteerbaar na INA-voorbehandeling, waaronder dus INA zélf (tomaatmetabolietnummer 212). Zie Tabel 4.1 en 4.6.

Het is goed te zien dat er minder metabolieten worden geproduceerd in vergelijking met de jasmonzuur behandeling. Dit was ook de verwachting, omdat in dit experiment geen meeldauw op de plant is aangebracht om het immuunsysteem tegen biotrofe organismen te activeren.

Tabel 4.6

Invloed van INA op productie van metabolieten in tomaat.

Tomaat	Verschil > 2x	Verschil > 4x	Verschil > 10x
Controle TO (laag) INA TO (hoog)	50	20	4
Controle TO (hoog) INA TO (laag)	6	3	1
Controle T1 (laag) INA T1 (hoog)	7	3	1
Controle T1 (hoog) INA T1 (laag)	11	2	0
Controle T2 (laag) INA T2 (hoog)	19	10	4
Controle T2 (hoog) INA T2 (laag)	33	8	3

4.4.3.2 Gerbera

Bij gerbera zien we dat er meer metabolieten zijn die een specifieke reactie op de INA behandeling geven (Tabel 4.7).

Tabel 4.7

Invloed van INA op productie van metabolieten in gerbera.

Gerbera	Verschil > 2x	Verschil > 4x	Verschil > 10x
Controle TO (laag) INA TO (hoog)	139	92	40
Controle TO (hoog) INA TO (laag)	57	19	7
Controle T1 (laag) INA T1 (hoog)	39	7	1
Controle T1 (hoog) INA T1 (laag)	22	9	3
Controle T2 (laag) INA T2 (hoog)	13	3	1
Controle T2 (hoog) INA T2 (laag)	62	18	3

4.5 Conclusie

Bij de kwantitatieve metingen aan plantenhormonen valt het op dat de niveaus van jasmonzuur en salicylzuur in gerbera hoger liggen dan die in tomaat. Dit resultaat correleert met de langzamere doorgroei van Botrytis lesions in gerberabladeren ten opzichte van tomaat. Gezien het feit dat in dit project het totaal gehalte aan salicylzuur bepaald is, dat wil zeggen als zijn vrije vorm ná enzymatische hydrolyse van de verschillende geconjugeerde vormen waarin het in de plant kan voorkomen, kunnen we niet zeggen of dit hogere totaal gehalte ten grondslag ligt aan dit verschil in doorgroei van de ziekteverwekker. Vervolgexperimenten bijvoorbeeld met meerdere rassen die verschillen in gevoeligheid voor Botrytis, van zowel tomaat als gerbera, zijn nodig om meer duidelijkheid te kunnen krijgen of het absolute gehalte aan (totaal) salicylzuur een rol speelt bij deze variatie in weerbaarheid en dus als marker gebruikt zou kunnen worden.

Bij de metabolietscreening zijn zowel in tomaat als in gerbera metabolieten gevonden die verhoogd worden door een korte (24 uur) en langere inductietijd (7 dagen). In tomaat is met name een specifiek-geconjugeerde vorm van cafeïnezuur een van de metabolieten die zeer sterk reageerden op voorbehandeling met de chemische activator jasmonzuur. Naast deze bekende tomatenmetaboliet zijn bij zowel tomaat als gerbera meerdere, nog onbekende metabolieten gevonden die goede perspectieven bieden als indicatoren voor de afweerreactie van de plant tegen necrotrofe organismen zoals Botrytis.

5 Glucanase activiteit

5.1 Doel

Systemic acquired resistance (SAR) wordt gekenmerkt door de expressie van algemeen voorkomende genen die coderen voor zogenoemde pathogenesis related proteins (PR-eiwitten). De groep van PR-2 eiwitten katalyseert de hydrolyse van bepaalde suikerpolymeren, en worden op grond daarvan beta-1-3-glucanases genoemd, hier kortweg aangeduid met 'glucanase'. Glucanase-activiteit kan daarom gebruikt worden als een merker voor SAR-expressie. De verwachting is dat glucanase-activiteit met name bij infectie met biotrofe schimmels geactiveerd zal worden. Door de glucanase activiteit op verschillende tijdstipmomenten te meten zijn veranderingen in het immuunsysteem betrouwbaar te bepalen.

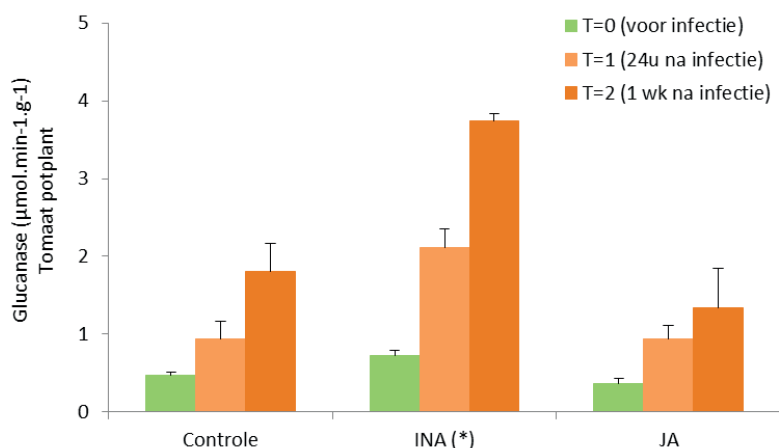
Doel van deze metingen is om meer inzicht te krijgen in welke mate deze groep wordt geactiveerd na blootstelling aan elicitors die gericht het afweersysteem stimuleren. Tevens zal dit meer inzicht geven in hoeverre het induceren van weerstand tegen een biotrofe organismen ten koste gaat van de afweer tegen necrotrofe organismen. Kortweg: is er een negatieve wisselwerking tussen beide afweersystemen? Binnen dit onderdeel zal ook validatie plaatsvinden in hoeverre eiwitmetingen in een vruchtgroentegewas (pilotgewas tomaat) overeenkomen met een sierteeltgewas (pilotgewas: gerbera). De eiwitmetingen zijn nu alleen gevalideerd voor het gewas tomaat en tabak. Dusver is het niet gelukt deze te valideren voor roos vanwege de interactie met fenolische stoffen die zich snel binden aan eiwitten.

5.2 Uitvoering

Bij het verzamelen van het bladmateriaal voor de eiwitanalyse is dit direct ingevroren in vloeibare stikstof en tot het moment van extractie bewaard bij -80 °C om denaturatie van eiwitten te voorkomen. In het lab is het bladmateriaal gemalen en verwerkt tot een extract. De activiteit van glucanase is bepaald door eiwit-extract te incuberen met laminarine en vervolgens de afgesplitste reducerende suikers na een kleuringsreactie spectrofotometrisch te kwantificeren.

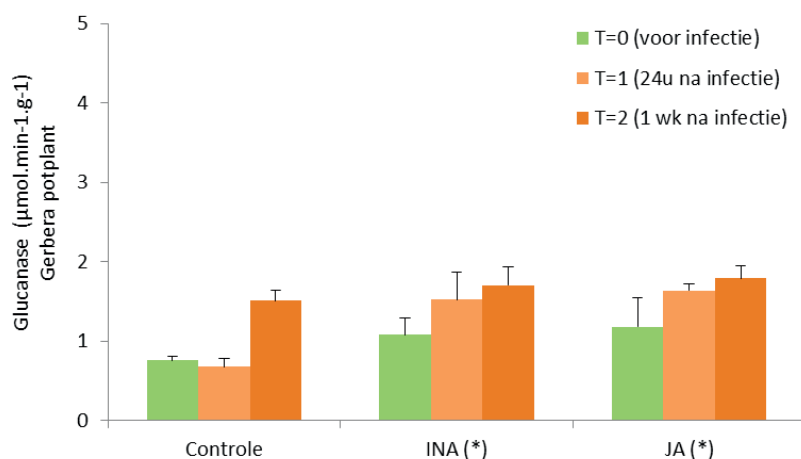
5.3 Resultaten

De resultaten van de glucanasemetingen in tomatenbladeren na inductie met afweerstimulanten laten heel mooi het patroon zien zoals we dat verwachten op basis van de literatuur (Figuur 5.1). Bij de controleplanten is duidelijk te zien dat na een besmetting met Botrytis de plant meer afweereiwitten aanmaakt en dat deze niveaus in de tijd sterk toenemen. In de planten die behandeld zijn met INA is er zowel voor als na infectie een verhoogde enzymactiviteit meetbaar ten opzichte van de onbehandelde controleplanten en de planten die behandeld zijn met jasmonzuur. Opvallend is dat deze verhoging ook al meetbaar is voordat de planten besmet zijn met Botrytis (T0) en de enzymactiviteit in INA behandelde planten met 50% is toegenomen ten opzichte van de controleplanten ($P < 0.03$). Wel worden de verschillen in enzymactiviteit groter na besmetting (T1 en T2). Na 24 uur en na één week zijn de gehalten in tomaat na behandeling met INA verdubbeld. Een behandeling met jasmonzuur geeft zoals verwacht geen verhoging van het enzymgehalte.



Figuur 5.1 Glucanase activiteit in tomatenbladeren na behandeling met INA (SAR inductie) of jasmonzuur (JA) op drie verschillende tijdstippen: voor infectie (T0) en 24 uur (T1) of 1 week na infectie (T2). De kolommen geven de gemiddeldes weer van 3 gepoolde samples van 4 planten plus de standaardfout. Uitslag MANOVA (Tukey's test $P < 0,05$): Inductie (C, INA, JA) ***, Timing monsternamen (T0, T1, T2) ***, Interactie $I \times T$ **. (*) bij de behandeling geeft een betrouwbare verhoging aan van de INA behandeling ten opzichte van de controle en jasmonzuurbehandeling (Tukey's test, $P < 0.05$).

De resultaten van de glucanasemetingen in gerberabladeren na inductie met afweerstimulanten laten een ander beeld zien dan in tomaten (Figuur 5.2). Verhoging van enzymactiviteit ten opzichte van de controleplanten vindt niet alleen plaats na behandeling met INA, maar ook door behandeling jasmonzuur. In vergelijking met de niveaus in de behandelde tomatenbladeren blijft het niveau van inductie na 24 uur in de INA behandelde planten veel lager. Bij het enzymniveau na één week zijn er geen verschillen meer meetbaar tussen de drie behandelingen. De inductie lijkt daarmee van zeer korte duur.



Figuur 5.2 Glucanase activiteit in tomatenbladeren na behandeling met INA (SAR inductie) of jasmonzuur (JA) op drie verschillende tijdstippen: voor infectie (T0) en 24 uur (T1) of 1 week na infectie (T2). De kolommen geven de gemiddeldes weer van 3 gepoolde samples van 4 planten plus de standaardfout. Uitslag MANOVA (Tukey's test $P < 0,05$): Inductie (C, INA, JA) *, Timing monsternamen (T0, T1, T2) **, Interactie $I \times T$ ns. (*) bij de behandelingen geeft een betrouwbare verhoging aan ten opzichte van de controlebehandeling (Tukey's test, $P < 0.05$).

5.4 Conclusie

De natuurlijke niveaus van PR-2 in gerbera komen overeen met die in tomaat en deze niveaus verdubbelen zich een week na besmetting. Stimulatie van verhoogde aanmaak van glucanase is mogelijk na behandeling van planten met INA in zowel tomaat als gerbera. In het sierteeltgewas lijkt ook een behandeling met jasmonzuur een positief effect te hebben op glucanasegehaltenes, maar de werking lijkt van kortere duur. Er is in beide gewassen geen negatief effect vastgesteld tussen een behandeling met jasmonzuur en de productie van afweereiwitten tegen meeldauw.

6 Genenscreening

6.1 Doel

Het doel is om een breed spectrum van genen te identificeren die betrokken zijn bij afweer en weerbaarheid tegen Botrytis in tomaat en gerbera. Hiervoor is gebruik gemaakt van Next Generation Sequencing. De tomaat pathogeen gerelateerde genen zullen ook worden getoetst op bruikbaarheid in een gerberagewas. Met deze kennis kan een indruk gekregen worden hoe generiek de processen zijn die betrokken zijn bij weerbaarheid van de verschillende gewassen.

6.2 Uitvoering en Resultaten

6.2.1 Profileren van het tomaten transcriptoom door middel van NGS

Een selectie van 4 mengmonsters (Tabel 6.1) zijn gebruikt voor paired-end (50bp) Next Generation Sequencing. NSure heeft de verkregen ruwe data geëvalueerd op kwantiteit en kwaliteit. NSure prefereert een opbrengst van minstens 20 miljoen hoog gekwalificeerde reads om een goede assembly uit te voeren en voor verdere data analyse. In Tabel 6.1 zijn het aantal ruwe 'reads' per monster weergegeven, evenals hun PHRED score. De PHRED score is een algemeen geaccepteerde methode om de kwaliteit van de DNA sequenties te kunnen vast stellen. Een PHRED score dicht bij de 40 wordt gezien als zeer goed. De gesequente monsters hadden een overvloedigheid aan reads van goede kwaliteit.

Tabel 6.1

Monstergegevens en kwaliteitsbepaling van de 'reads' in tomaat.

Monster	Mengmonster	# ruwe reads ($\times 10^6$)	gemiddelde PHRED score
Controle T0	Controle T0 1-4 Controle T0 5-8 Controle T0 9-12	66.13	37.0
Controle T2	Controle T2 37-40 Controle T2 41-44 Controle T2 45-48	56.98	37.0
JA T0	JA T0 25-28 JA T0 29-32 JA T0 33-36	52.21	37.0
JA T2	JA T2 61-64 JA T2 65-68 JA T2 69-72	50.46	37.0

Alle reads zijn vervolgens gebruikt voor een 'de novo assembly', een methode waarin een transcriptoom (verzameling van alle RNA moleculen) wordt gecreëerd zonder de hulp van een referentie genoom. De 'de novo assembly' resulteerde uiteindelijk in 73.860 genen.

Vervolgens is per monster bepaald welke genen tot expressie kwamen en is het daarbij behorende expressieniveau (RPKM) bepaald. Genen die zeer laag tot expressie kwamen in alle gesequente monsters zijn niet gebruikt voor de verdere analyse. Dit resulteerde uiteindelijk in 22.674 genen.

6.2.2 Identificatie van tomaten genen die betrokken zijn bij een Botrytis infectie

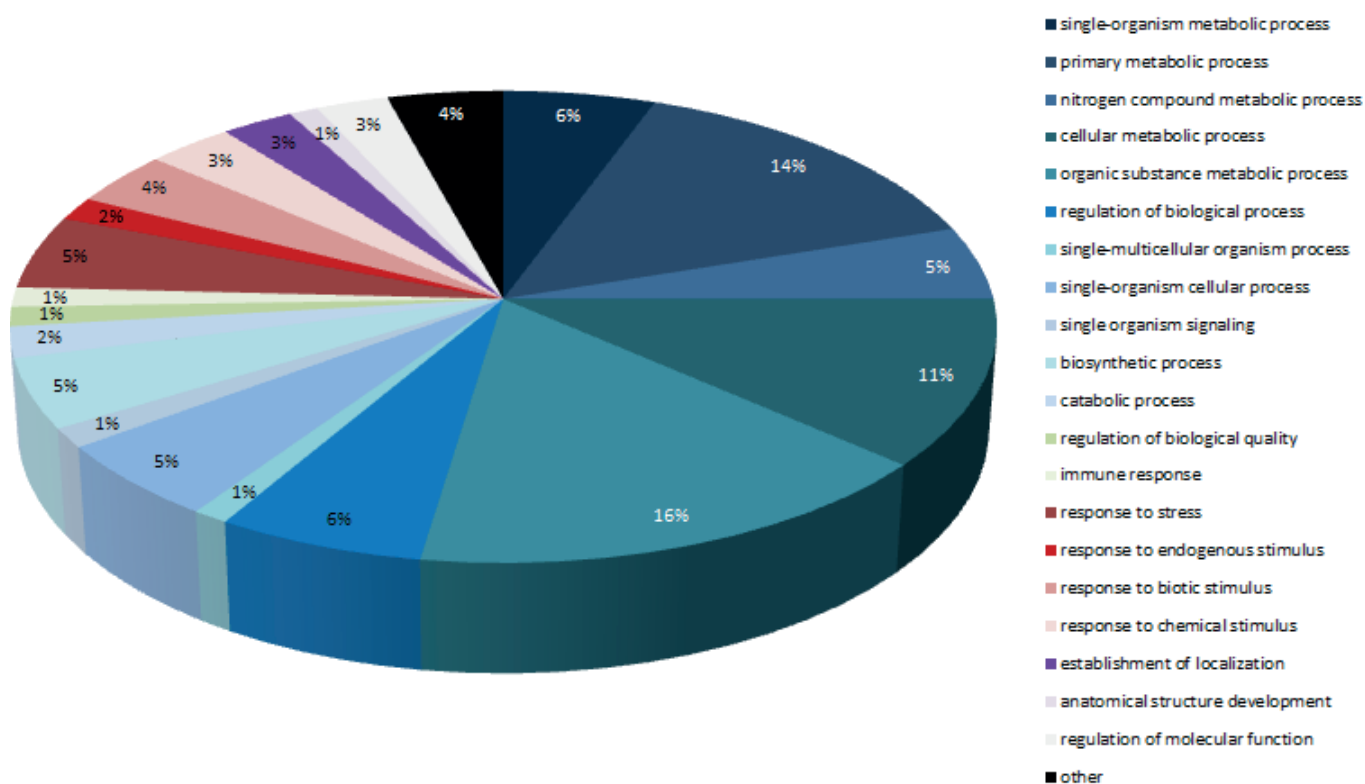
Om tomaten genen te kunnen identificeren die differentieel tot expressie kwamen ten gevolge van een Botrytis infectie, zijn de transcriptomen voor (T0) en een na week inoculatie (T2) met elkaar vergeleken (Tabel 6.2). Zoals verwacht, kwamen zeer veel genen verschillend tot expressie wanneer planten werden geïnfecteerd met Botrytis, ongeacht wat voor behandeling de planten hadden gekregen (controle of JA; Tabel 6.2). Benadrukt moet worden dat deze differentiële genexpressie een systemisch respons betrof, de geïnoculeerde bladeren waren immers niet bemonsterd.

Tabel 6.2

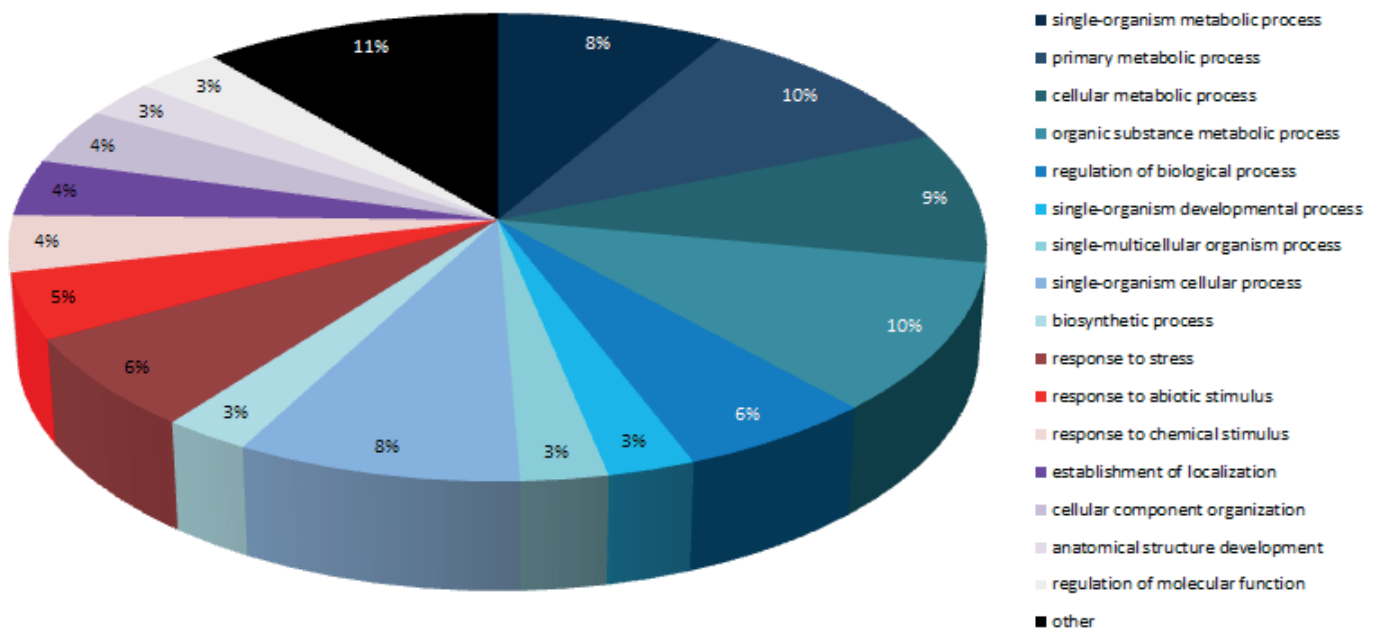
Aantal genen die differentieel tot expressie kwamen ten gevolge van de Botrytis infectie in tomaat.

Vergelijking				verschil > 2X	verschil > 4X	verschil > 10X
Controle T0	laag	Controle T2	hoog	5150	331	14
Controle T0	hoog	Controle T2	laag	1447	80	14
JA T0	laag	JA T2	hoog	4649	412	34
JAT0	hoog	JA T2	laag	2364	381	116

Om een idee te krijgen wat voor soort genen worden geactiveerd of geïnactiveerd ten gevolge van de Botrytis inoculatie in de controle planten, is voor elk differentieel gen (Tabel 6.2; >4X) afzonderlijk bekeken in welk(e) biologisch(e) proces(sen) ze betrokken zijn (Figuur 6.1 en 6.2). Een behoorlijk percentage van deze genen bleek betrokken te zijn bij verscheidene metabolische en biologische processen. Zoals verwacht, werden ook diverse stress gerelateerde genen beïnvloed.

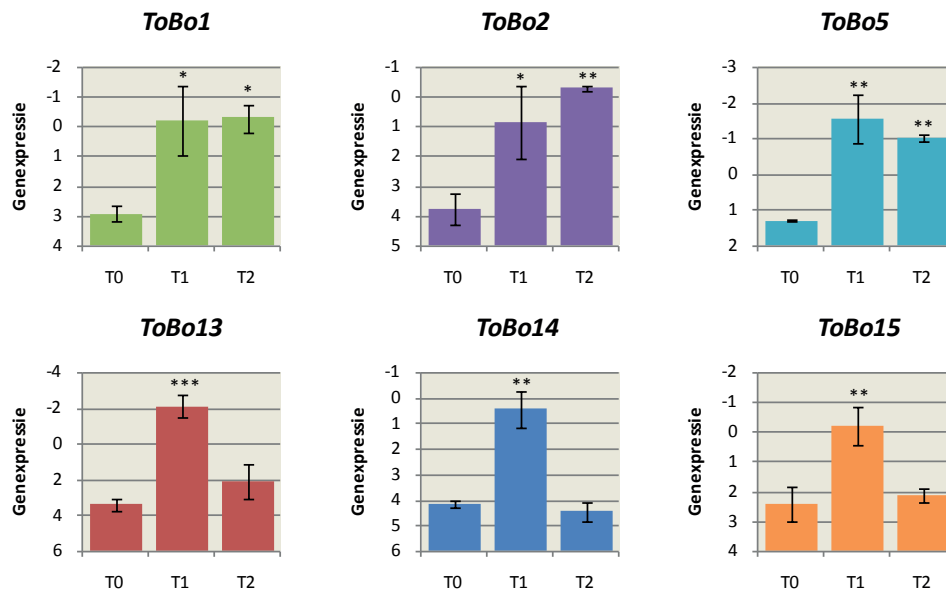


Figuur 6.1 Classificatie van genen die geactiveerd worden ten gevolge van de Botrytis inoculatie in controle planten. Na inoculatie (T2) werden 331 genen geïnduceerd met een verschil >4X (Tabel 6.2). Van de 331 genen konden 115 genen in 1 of meerdere biologische functies ingedeeld worden. Alleen biologische functies met een score groter dan 4 zijn weergegeven. Biologische functies met een score lager dan 4 zijn verwerkt onder 'other'.



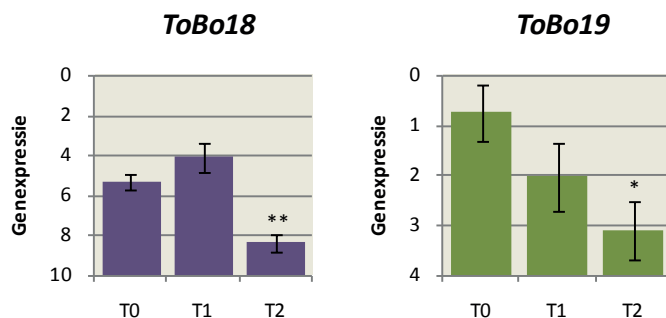
Figuur 6.2 Classificatie van genen die geïnactiveerd worden ten gevolge van de *Botrytis* inoculatie in controle planten. Na inoculatie (T2) werden 80 genen geïnactiveerd met een verschil >4X (Tabel 6.2). Van de 80 genen konden 53 genen in 1 of meerdere biologische functies ingedeeld worden. Alleen biologische functies met een score groter dan 4 zijn weergegeven. Biologische functies met een score lager dan 4 zijn verwerkt onder 'other'.

Voor een aantal genen, die het grootste genexpressieverschil lieten zien tussen niet (T0) en geïnfecteerde (T2) planten, zijn primers ontworpen (stukjes DNA die nodig zijn voor de PCR amplificatie van het desgewenste gen), zodat de genexpressieprofielen van deze genen met behulp van de qPCR methode kon worden bepaald voor alle verzamelde monsters.



Figuur 6.3 Genexpressie van een aantal tomaat pathogeen gerelateerde genen in onbehandelde tomaten planten voor en na infectie met *Botrytis*. T0) dag van inoculatie, T1) dag na inoculatie, T2) week na inoculatie. ToBo1, ToBo2 en ToBo5 worden lang geïnduceerd na infectie. ToBo13, ToBo14 en ToBo15 kort. N=3. Statistische vergelijking (Dunnett) tussen T0 en T1/T2. P waarde *^{0.05} **^{0.01} ***^{0.001}.

In Figuur 6.3 is een selectie van genen weergegeven die geïnduceerd werden ten gevolge van de *Botrytis* infectie in de controle planten. Al na 1 dag na inoculatie (T1) werd voor alle genen een verhoogde inductie in genexpressie waargenomen. Echter, genen zoals ToBo13, ToBo14 en ToBo15 werden slechts kort geïnduceerd (kort respons), terwijl ToBo1, ToBo2 en ToBo5 langer actief bleven (lang respons). In Figuur 6.4 zijn expressieprofielen van twee genen weergegeven die ten gevolge van een *Botrytis* infectie geremd werden.



Figuur 6.4 Genexpressie van twee tomaat pathogeen gerelateerde genen in onbehandelde tomaten planten voor en na infectie met *Botrytis*. T0) dag van inoculatie, T1) dag na inoculatie, T2) week na inoculatie. Expressie van ToBo18 en ToBo19 wordt geremd na infectie. N=3. Statistische vergelijking (Dunnett) tussen de T0 en T1/T2. P waarde *^{0.05} **^{0.01}

6.2.3 Invloed van jasmonzuur (JA) op tomatenplanten

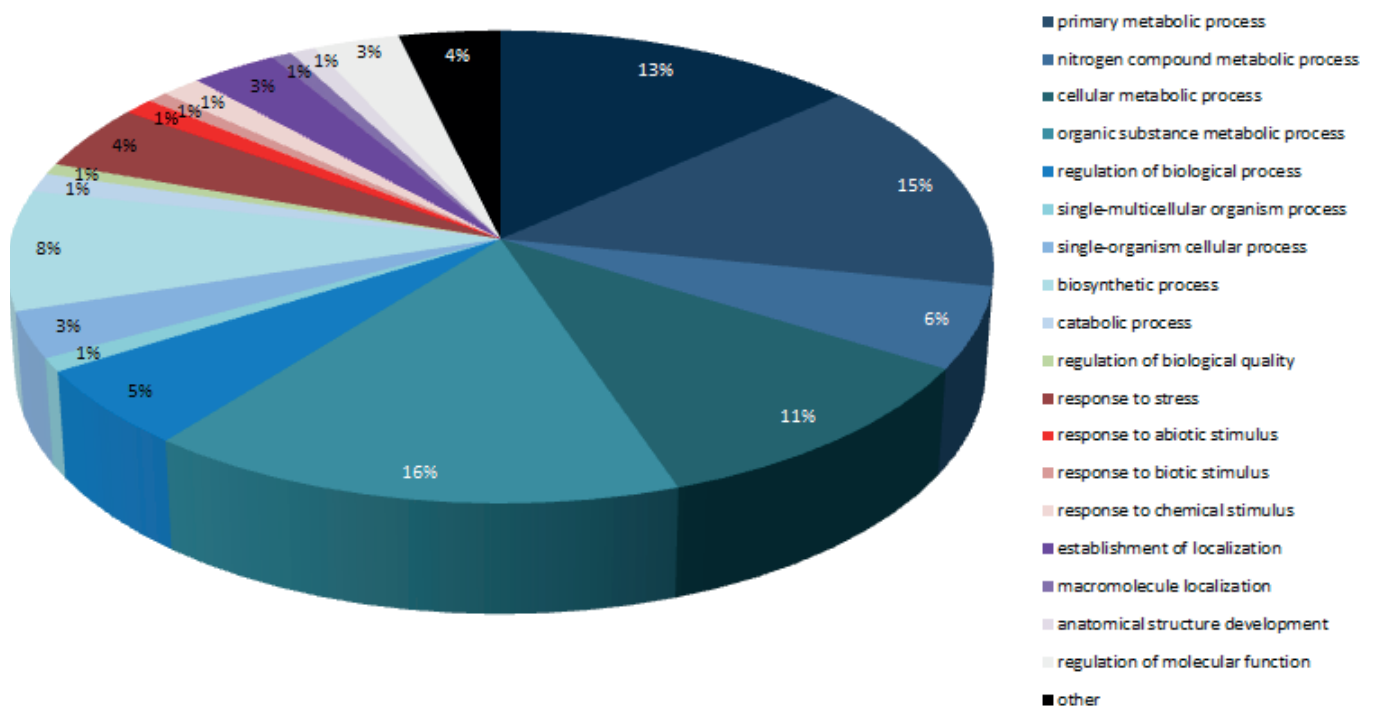
Van JA is bekend dat dit hormoon betrokken is bij de afweer tegen *Botrytis*. Om de invloed van JA te onderzoeken op moleculair niveau, zijn de transcriptomen van controle en JA behandelde planten voor inoculatie (T0) en een week na inoculatie (T2) vergeleken (Tabel 6.3). JA bleek een grote invloed te hebben; al voor de inoculatie met *Botrytis* kwamen maar liefst 329 genen 4 keer hoger tot expressie in JA behandelde planten in vergelijking tot de controle planten (Tabel 6.3).

Tabel 6.3

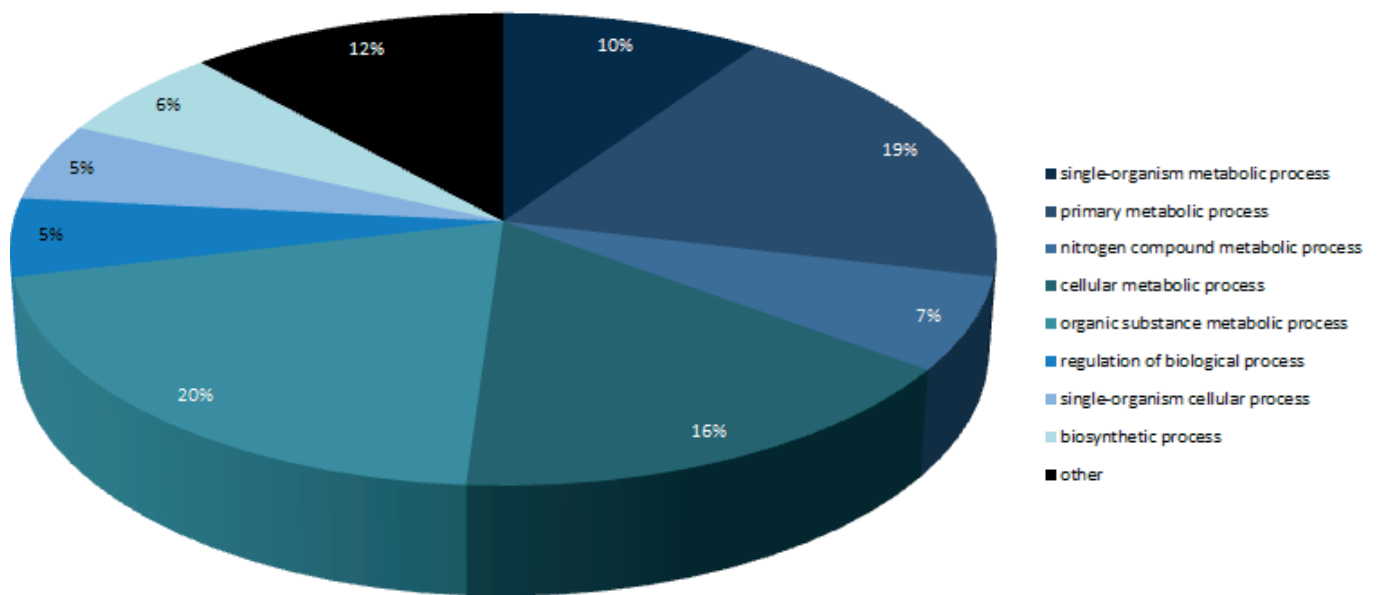
Aantal genen die differentieel tot expressie komen ten gevolge van de JA behandeling in tomaat.

Vergelijking				verschil > 2X	verschil > 4X	verschil > 10X
Controle T0	laag	JA T0	hoog	2199	329	136
Controle T0	hoog	JA T0	laag	2789	129	6
Controle T2	laag	JA T2	hoog	604	23	4
Controle T2	hoog	JA T2	laag	2176	125	21

Om in kaart te kunnen brengen wat voor soort genen geactiveerd of geïnactiveerd worden ten gevolge van een JA behandeling voor inoculatie (T0), is voor elk differentieel gen (Tabel 6.3; >4X) bekeken in welk(e) biologisch(e) proces(sen) ze betrokken zijn (Figuur 6.5 en 6.6). Een behoorlijk percentage van deze genen bleken gelieerd te zijn aan verscheidene metabolische en biologische processen, maar ook diverse stress gerelateerde genen werden beïnvloed.

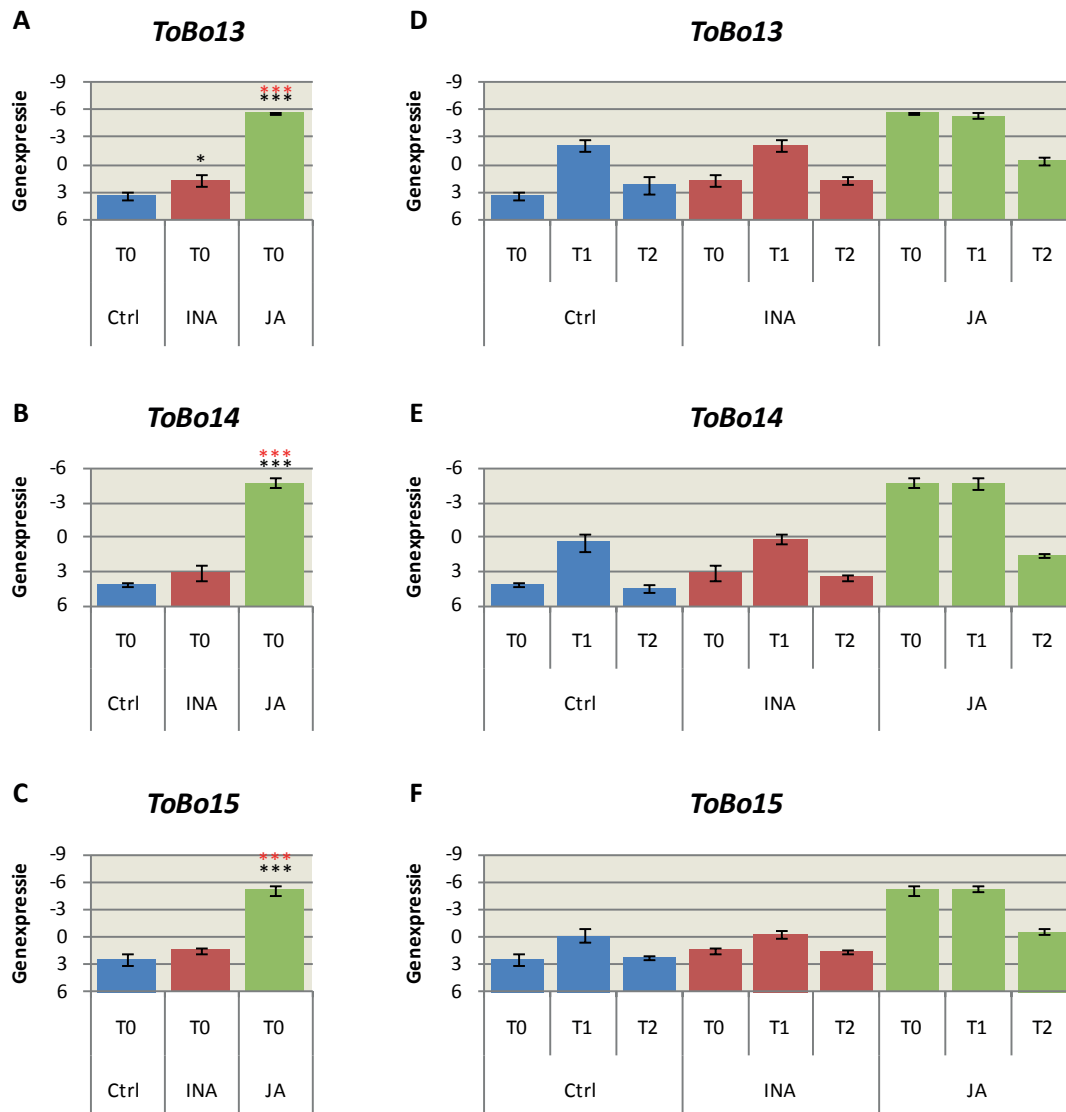


Figuur 6.5 Classificatie van genen die geactiveerd worden ten gevolge van een JA behandeling voor de inoculatie met *Botrytis* (T0). Een JA behandeling induceerde 329 genen met een verschil >4X (Tabel 6.3). Van de 329 genen konden 207 genen in 1 of meerdere biologische functies ingedeeld worden. Alleen biologische functies met een score groter dan 4 zijn weergegeven. Biologische functies met een score lager dan 4 zijn verwerkt onder 'other'.



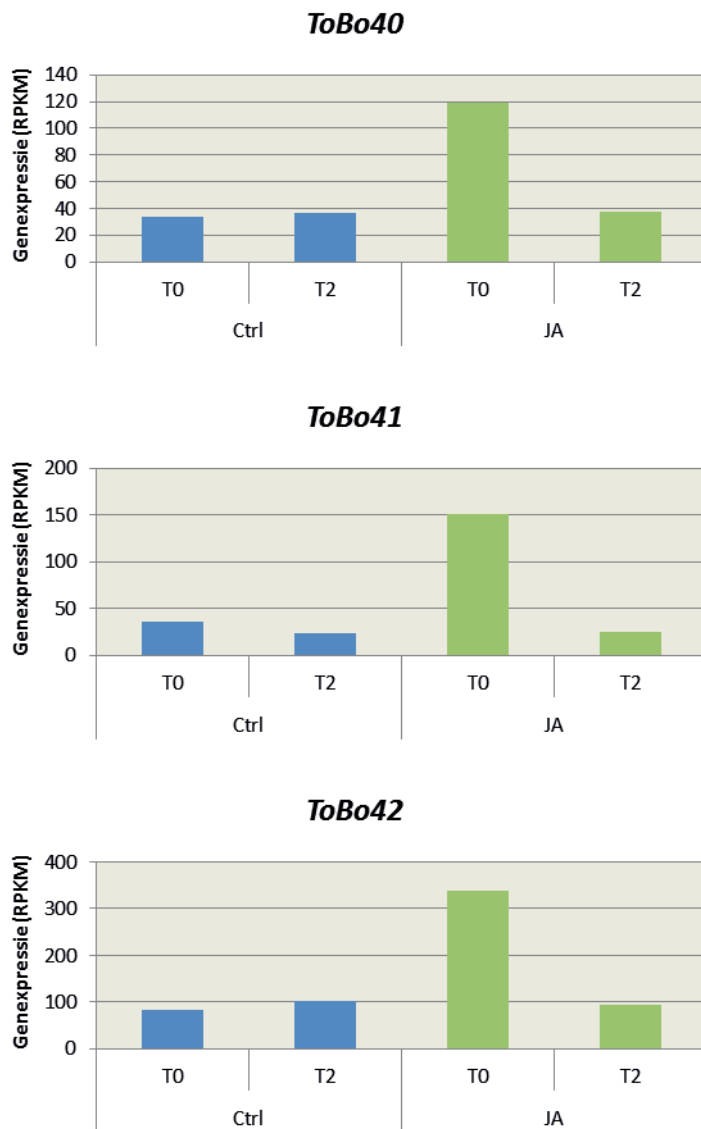
Figuur 6.6 Classificatie van genen die geïnactiveerd worden ten gevolge van een JA behandeling voor de inoculatie met *botrytis* (T0). Een JA behandeling remde 129 genen met een verschil >4X (Tabel 6.3). Van de 129 genen konden 34 genen in 1 of meerdere biologische functies ingedeeld worden. Alleen biologische functies met een score groter dan 4 zijn weergegeven. Biologische functies met een score lager dan 4 zijn verwerkt onder 'other'.

Voor een aantal genen met het grootste genexpressieverschil tussen JA behandelde en controle planten voor inoculatie (T0) zijn primers ontworpen, zodat de genexpressieprofielen van deze genen kon worden bepaald voor alle ingevroren monsters met behulp van de qPCR methode (Figuur 6.7). In figuur 6.7 A-C, is duidelijk te zien dat de expressie van ToBo13, ToBo14 en ToBo15 significant hoger is in de JA behandelde planten ten opzichte van de controle en INA behandelde planten voor inoculatie (T0). Interessant, deze genen bleken ook kort geïnduceerd te worden in de controle en de INA behandelde planten na inoculatie (Figuur 6.7 D-F). In de JA behandelde planten lag het expressieniveau van ToBo13, ToBo14 en ToBo15 na een dag inoculatie (T1) significant hoger in vergelijking tot de controle en INA behandelde planten (Figuur 6.7 D-F). Echter na verloop van tijd ging de expressie van deze genen ook in de JA behandelde planten omlaag (Figuur 6.7 D-F).



Figuur 6.7 Genexpressie van een aantal tomaten genen die geïnduceerd worden na een JA behandeling. T0) dag van inoculatie, T1) dag na inoculatie, T2) week na inoculatie. N=3. A-C) Vergelijking van ToBo13, ToBo14 en ToBo15 expressie tussen de T0 monsters. Statistische vergelijking (Dunnett) tussen de controle planten en JA/INA behandelde planten. P waarde: '*' 0.05, '***' 0.001. Statistische vergelijking (Dunnett) tussen de JA planten en INA behandelde planten. P waarde: '****' 0.001. D-F) ToBo13, ToBo14 en ToBo15 expressie profiel en op T0, T1 en T2.

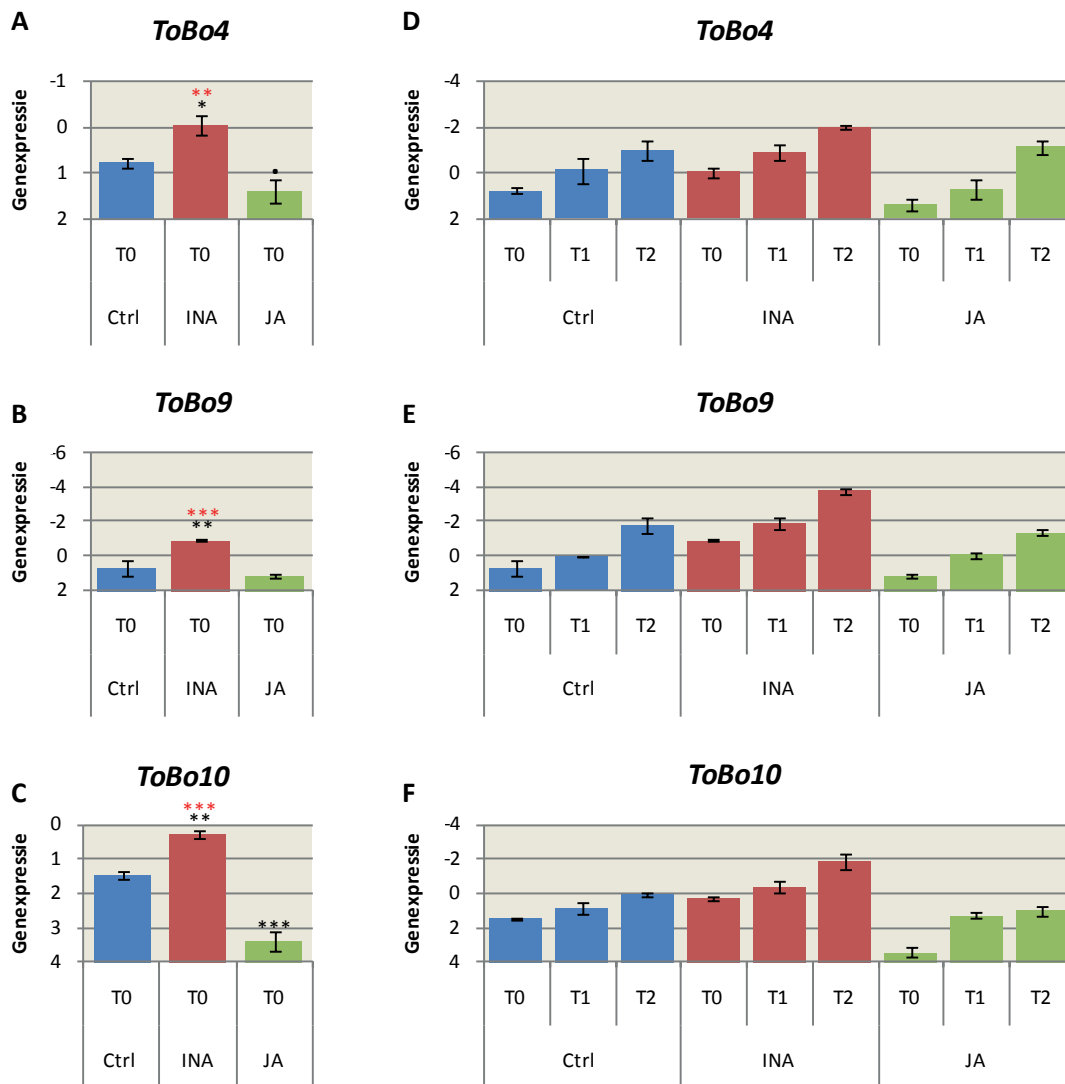
De metabolietscreening in tomaat liet zien dat een geconjugeerde vorm van cafeïnezuur sterk reageerde op voorbehandeling met JA (4.4.2.1). Cafeïnezuur wordt geproduceerd in de fenylpropanoïde route, een route waarin tal van stoffen geproduceerd worden die betrokken zijn bij het afweermecanisme van de plant. Drie genen die functioneren in de fenylpropanoïde route worden ook geïnduceerd door JA (Figuur 6.8).



Figuur 6.8 Genexpressie van een drietal genen die deel uit maken van de phenylpropanoide route. T0) dag van inoculatie, T2) week na inoculatie.

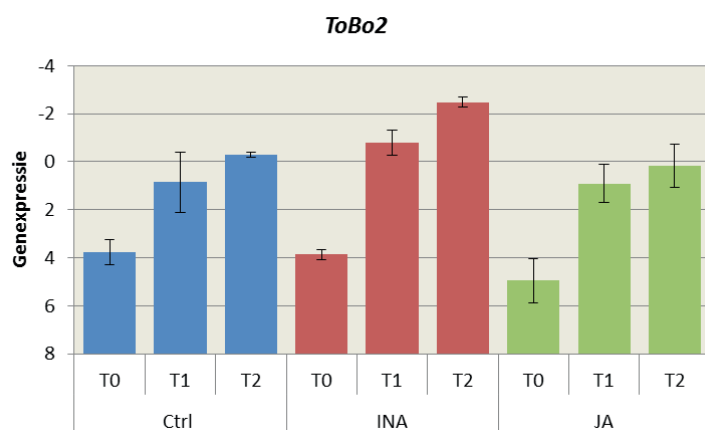
6.2.4 Invloed van INA op tomatenplanten

Hoewel er geen Next Generation Sequencing is uitgevoerd op de INA behandelde planten, zijn de monsters wel meegenomen in de qPCR analyse. Wat daarin opviel, was dat een aantal van de genen die lang actief bleven ten gevolge van een Botrytis infectie, al verhoogd tot expressie kwamen in de INA behandelde planten voor inoculatie (T0, Figuur 6.9 A-C). Deze genen werden niet door JA geïnduceerd alvorens de inoculatie (T0). De expressie werd zelfs in sommige gevallen geremd (Figuur 6.9 A-C). Na inoculatie ging de expressie van deze genen omhoog ongeacht de behandeling (Figuur 6.9 D-F).



Figuur 6.9 Genexpressie van een aantal tomaten genen die geïnduceerd worden na een INA behandeling. T0) dag van inoculatie, T1) dag na inoculatie, T2) week na inoculatie. N=3. A-C) Vergelijking van ToBo1/4/10 expressie tussen de T0 monsters. Statistische vergelijking (Dunnett) tussen de controle planten en JA/INA behandelde planten. P waarde: * 0.1 ** 0.05 *** 0.01 **** 0.001. Statistische vergelijking (Dunnett) tussen de INA behandelde planten en JA behandelde planten. P waarde *** 0.01 **** 0.001. D-F) ToBo4, ToBo9 en ToBo10 expressie profielen op T0, T1 en T2.

Planten die voorbehandeld waren met INA bleken een verhoogde glucanase enzymactiviteit te hebben ten opzichte van de onbehandelde controleplanten en de JA behandelde planten (Figuur 5.1). NSure heeft het expressiepatroon van één glucanase onderzocht (Figuur 6.10). In tegenstelling tot de enzymmeting, die de enzymactiviteit van meerdere enzymen meet die glucanase activiteit vertonen, werd er voor deze specifieke glucanase nog geen verhoging van glucanase gemeten in de INA behandelde planten voordat ze geïnoculeerd waren met *Botrytis* (T0). Dit werd echter wel duidelijk zichtbaar na een week na inoculatie. Vergelijkbaar met de enzymmeting, gaf een behandeling met JA geen verhoging van glucanase.



Figuur 6.10 Genexpressiepatroon van een glucanase, ToBo2. T0) dag van inoculatie, T1) dag na inoculatie, T2) week na inoculatie. N=3.

6.2.5 Bruikbaarheid van geïdentificeerde tomaat pathogeen gerelateerde genen in gerbera

Primers van een 20tal geïdentificeerde tomaat pathogeen gerelateerde genen zijn vervolgens getoetst op de bruikbaarheid in bladmateriaal van gerbera. Dit bleek niet mogelijk; in geen van de qPCR reacties werd een PCR product gevormd. Dit is te wijten aan het genetische verschil tussen tomaat en gerbera. Aangezien er ook geen database beschikbaar was met genetische informatie over gerbera, kon er ook niet gezocht worden naar gerbera equivalenten van de tomaat pathogeen gerelateerde genen.

6.2.6 Profileren van het gerbera transcriptoom door middel van NGS

Aangezien het niet mogelijk bleek om simpelweg de primers van de tomaat pathogeen gerelateerde genen te gebruiken op gerbera, heeft NSure besloten om paired-end (50bp) Next Generation Sequencing uit te voeren op controle mengmonsters van blad voor en na een week inoculatie (Tabel 6.4). De ruwe data van beide mengmonsters bleken van goede kwaliteit, het aantal ruwe reads lag ver boven de geëiste 20 miljoen reads en de PHRED score lag in de buurt van de 40.

Alle reads zijn vervolgens gebruikt voor een 'de novo assembly'. De 'de novo assembly' resulteerde uiteindelijk in 33.968 genen. Genen die zeer laag tot expressie kwamen in alle gesequencete monsters zijn voor de verdere analyse niet gebruikt. Dit resulteerde uiteindelijk in 20.436 genen. Na de assembly is per monster bepaald welke genen tot expressie kwamen en is het daarbij behorende expressieniveau (RPKM) bepaald.

Tabel 6.4

Monstergegevens en kwaliteitsbepaling van de 'reads' in gerbera.

Monster	Mengmonster	# ruwe reads (x10 ⁶)	gemiddelde PHRED score
Controle T0	Controle T0 1-4 Controle T0 5-8 Controle T0 9-12	68.47	38.39
Controle T2	Controle T2 37-39 Controle T2 41-43 Controle T2 45-47	57.61	38.38

6.2.7 Identificatie van gerbera genen die betrokken zijn bij een botrytis infectie

Om gerbera genen te kunnen identificeren die differentieel tot expressie kwamen ten gevolge van een botrytis infectie, zijn de transcriptomen voor (T0) en na een week inoculatie (T2) met elkaar vergeleken (Tabel 6.5). Net zoals in tomaat, werd een duidelijk systemisch respons waargenomen na inoculatie met botrytis.

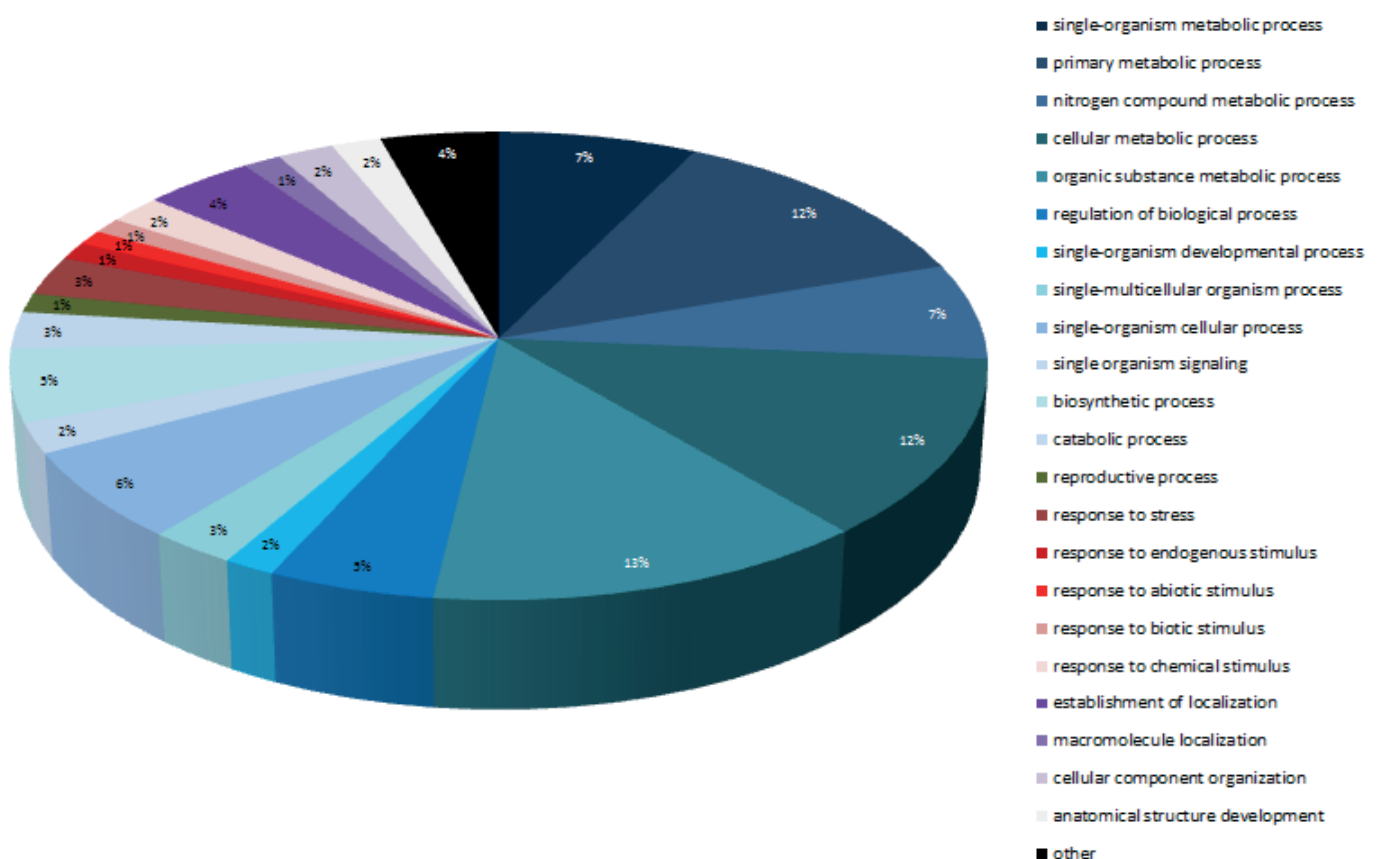
Tabel 6.5

Aantal genen die differentieel tot expressie kwamen ten gevolge van de botrytis infectie in gerbera.

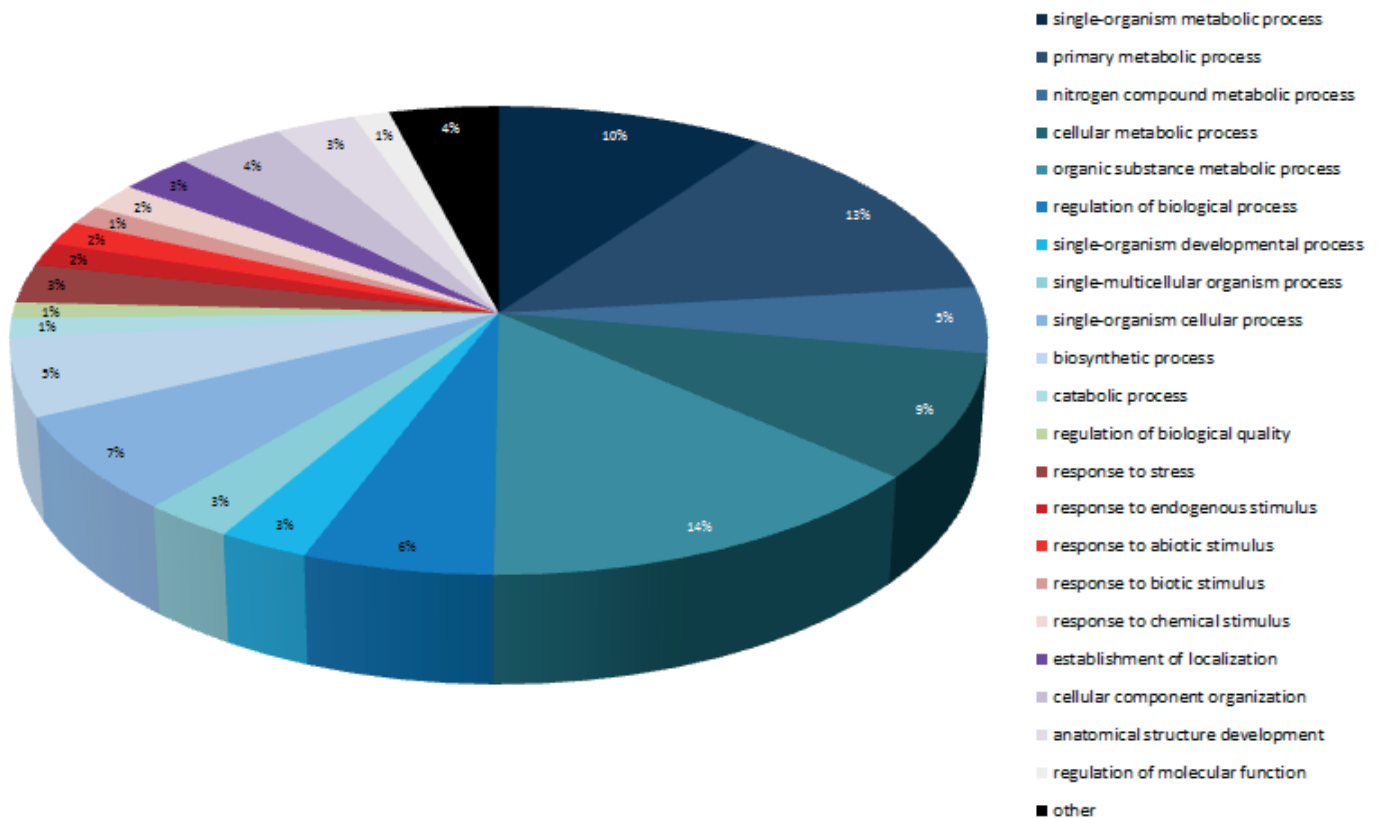
Vergelijking				verschil > 2X	verschil > 4X	verschil > 10X
Controle T0	laag	Controle T2	hoog	4681	891	187
Controle T0	hoog	Controle T2	laag	3251	306	35

In tegenstelling tot tomaat, bleek een aanzienlijke hoeveelheid van de differentiële genen afkomstig te zijn van pathogenen en niet van gerbera of botrytis.

Voor elk differentieel gen (Tabel 6.5; >4X) is vervolgens vastgesteld in welk(e) biologisch(e) proces(sen) ze betrokken zijn (Figuur 6.11 en 6.12). Evenals voor tomaat, bleek een behoorlijk percentage van deze genen betrokken te zijn bij verscheidene metabolische en biologische processen. Ook werden diverse stress gerelateerde genen beïnvloed.

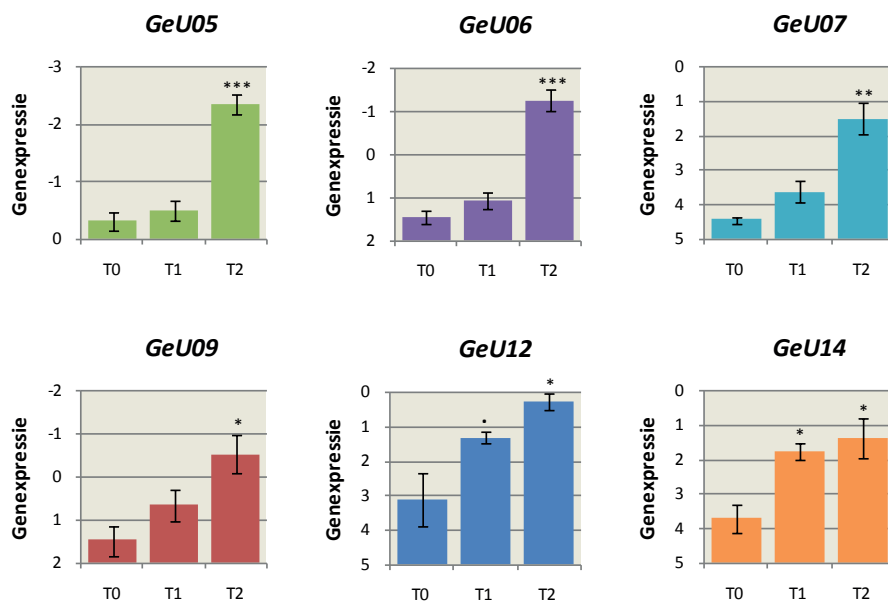


Figuur 6.11 Classificatie van genen die geactiveerd worden ten gevolge van de Botrytis inoculatie in controle planten. Na inoculatie (T2) werden 891 genen geactiveerd met een verschil >4X (Tabel 6.5). Van de 891 genen konden 479 genen in 1 of meerdere biologische functies ingedeeld worden. Biologische functies met een score lager dan 15 zijn verwerkt onder 'other'.



Figuur 6.12 Classificatie van genen die geïnactiveerd worden ten gevolge van de *Botrytis* inoculatie in controle planten. Na inoculatie (T2) werden 306 genen geïnactiveerd met een verschil >4X (Tabel 6.5). Van de 306 genen konden 123 genen in 1 of meerdere biologische functies ingedeeld worden. Biologische functies met een score lager dan 4 zijn verwerkt onder 'other'.

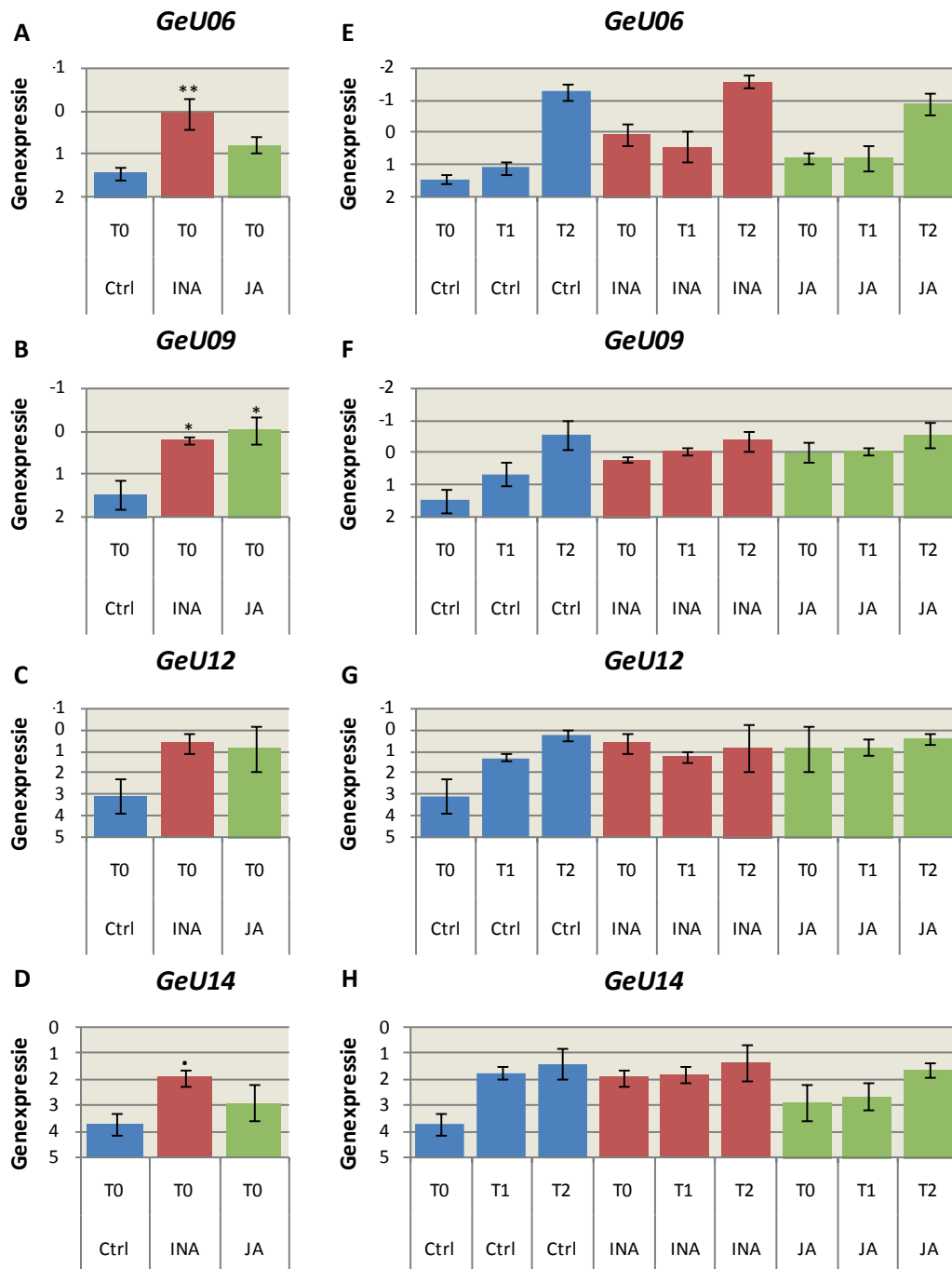
Op basis van de genidentiteit en de grootte van het expressieverschil tussen niet (T0) en geïnfecteerde (T2) planten zijn een aantal genen geselecteerd waarvoor primers zijn ontworpen, zodat de genexpressieprofielen van deze genen kon worden bepaald in alle ingevroren monsters met behulp van qPCR.



Figuur 6.13 Genexpressie van een aantal tomaat pathogeen gerelateerde genen in onbehandelde gerbera planten voor en na infectie met *Botrytis*. T0) dag van inoculatie, T1) dag na inoculatie, T2) week na inoculatie. N=3. Statistische vergelijking (Dunnett) tussen de T0 en T1/T2. P waarde '.' 0.1 '*' 0.05 '**' 0.01 '***' 0.001.

In figuur 6.13 is een selectie van genen weergegeven die geïnduceerd werden ten gevolge van de botrytis infectie in de controle planten. Al na 1 dag na inoculatie (T1) werd voor verscheidene genen zoals GeU09, GeU12 en GeU14 een verhoogde inductie in genexpressie waargenomen.

De expressiepatronen van ~15 gerbera pathogeen gerelateerde genen zijn ook bepaald in planten die voorbehandeld waren met INA of JA. Zowel JA of INA induceerde de expressie van verscheidene pathogeen gerelateerde genen (Figuur 6.14).



Figuur 6.14 Genexpressie van een aantal gerbera genen die geïnduceerd worden na een hormoon behandeling. T0) dag van inoculatie, T1) dag na inoculatie, T2) week na inoculatie. N=3. A-D) Vergelijking van GeU06/ U09/U12/U14 expressie tussen de T0 monsters. Statistische vergelijking (Dunnett) tussen de controle planten en JA/INA behandelde planten. P waarde: * 0.1 ** 0.05 *** 0.01 **** 0.001. Er was geen statistisch verschil tussen de INA behandelde planten en JA behandelde planten. E-H) GeU06, GeU09, GeU12 en GeU14 expressie profielen op T0, T1 en T2.

6.3 Conclusie

In tomaat kwamen duizenden genen verschillend tot expressie na een infectie met Botrytis. Een aantal van deze genen zouden in de toekomst gebruikt kunnen worden om in een vroeg stadium Botrytis op te sporen in tomaat. Op basis van de bevindingen met de genenscreening, lijken JA specifieke genen kort geïnduceerd te worden na een infectie in tomaat, terwijl INA geïnduceerde genen een langdurige activiteit na infectie vertonen. Door het genetische verschil tussen tomaat en gerbera bleek het niet mogelijk om de pathogeen gerelateerde genen van tomaat direct te gebruiken op gerbera. Door direct te sequencen op gerbera zijn deze echter wel geïdentificeerd en zouden na een validatie in de toekomst gebruikt kunnen worden om vroegtijdig Botrytis in gerbera op te sporen.

7 Conclusie en Discussie

7.1 Chemische activatie systemische afweer is mogelijk

De biotoetsen in jonge pottomaat planten laten zien dat via een lokale behandeling van één blad met jasmonzuur, de niet- behandelde bladeren ook een verhoogde systemische afweerrespons laten zien en dat dit gepaard gaat met een verminderde gevoeligheid voor Botrytis. Opvallend hierbij is dat de niveaus van de beoogde signaalstof betrokken bij deze afweerrespons, het plantenhormoon jasmonzuur, zich in tomaat onder de detectiegrens bevonden van de toegepaste analysetechniek zelfs na activatie met een chemische elicitor. Op moleculair niveau was echter wel een sterke (korte) respons meetbaar op pathogeen gerelateerde genen. De geïnduceerde systemische afweer gaf een verminderde gevoeligheid van ongeveer 40% in tomatenbladeren. De planten die met jasmonzuur waren behandeld, werden nog wel ziek, maar het ziekteverloop was sterk vertraagd. Het verhogen van natuurlijke verdedigingsresponsen kan hiermee in de praktijk al een eerste belangrijke stap zijn naar een betere beheersing van schimmelziekten. Daarnaast zal dit een vermindering van inzet van curatieve middelen kunnen geven, doordat infecties zich minder snel uitbreiden in een vroeg stadium zijn te behandelen.

7.2 Sterke natuurlijke afweer in gerbera

De biotoetsen met Botrytis in de potgerbera laten zien dat de infectie van de bladeren nauwelijks de kans kreeg om uit te groeien en volledig beperkt bleven tot het besmette blad. Het vormde daarmee een groot contrast met de gevoeligheid van de pottomaten, waar hele plantendelen waren aangetast na enkele weken. De gerberaplanten waren – na het traag opkomen van infectie - zelfs onder nog extremere vochtcondities gezet dan de tomatenplanten, om de doorgroei van de schimmel nog beter te bevorderen. Ook de aanwezigheid van een optimale voedingsbodem voor de schimmel, namelijk een wondvlak met afstervende cellen, leek weinig invloed te hebben op het infectieverloop. In de metabolietanalyses waren bij alle behandelingen in gerbera meetbare hoeveelheden van de signaalstof jasmonzuur terug te vinden in vergelijking met de tomatenplanten. Alle behandelingen laten echter ook vóór Botrytis infectie al een relatief hoog niveau van jasmonzuur zien, die na infectie niet verder toeneemt maar juist afneemt. Deze gerbera planten, verkregen van een kweker, waren bij de inzet van de proef al enkele weken oud en besmet met een natuurlijke infectie van Botrytis en diverse andere ziekteverwekkers, zoals geconcludeerd kon worden uit de genexpressie data van NSure. De afweerreacties waren dus vóór onze experimenten met chemische activators al volop in staat van paraatheid. Desondanks heeft deze natuurlijke infectie geen verstorende invloed gehad op de uitkomsten van ons onderzoek en was het kennelijk nog steeds mogelijk om de kunstmatig aangebrachte Botrytis infectie te remmen in de bloemen. In hoeverre dit een bijdrage is als gevolg van extra aanmaak van natuurlijk jasmonzuur is lastig te zeggen, omdat deze meting geen verhoogde waarde laat zien na toediening van JA. Wel zien we in de brede metabolietscreening terug dat er in de gerberaplanten na behandeling met jasmonzuur een aantal metabolieten zijn die binnen 24 uur of binnen 7 dagen in verhoogde concentraties in de bladeren worden aangetroffen. De identiteit en functie van deze metabolieten dient nog verder te worden onderzocht. Moleculaire analyse heeft in zowel tomaat als gerbera tot de identificatie geleid van indicatorgenen, die in de toekomst gebruikt kunnen worden om in een vroeg stadium Botrytis te detecteren.

7.3 Cultivarverschillen

In dit onderzoek is er voor gekozen om maar één cultivar van elk gewas te gebruiken waardoor de uitkomsten nog niet generiek per gewas zijn te vertalen. Een logische vervolgstap zal zijn om meerdere cultivars te toetsen en om te onderzoeken of de verschillende metingen gericht op de detectie van natuurlijke afweerstoffen voldoende houvast kunnen bieden om de ziektegevoeligheid tussen cultivars vast te leggen. Tevens zal het dan mogelijk worden om in het veredelingsproces steeds gericht en vroeger minder gevoelige soorten op te sporen. De ontwikkelde ziekteprotocollen bij WUR voor dit onderzoek laten zich goed vertalen naar andere toetsgewassen die gevoelig zijn voor *Botrytis* (of andere bladziekten). Hiermee is een eerste ruwe en goedkope screening mogelijk op ziektegevoeligheid tussen cultivars. De productie van verschillende enzymniveaus staat beschreven als een betrouwbare merker om gevoeligheid tussen gerstecultivars te meten. In het handboek van Agrios (2005) wordt een voorbeeld aangehaald waarin twee bijna isogene gerstecultivars die blootgesteld worden aan echte meeldauw verschillen laten zien ten aanzien van de productie van glucanase activiteit. De resistente cultivar met een extra resistentiegen vertoont twee keer zoveel activiteit van afweereiwitten dan de gevoelige cultivar. Daarnaast is bekend dat fenolische verbindingen toxisch zijn voor ziekteverwekkers en na infectie op een hoger niveau en sneller aanwezig zijn in resistente cultivars ten opzichte van gevoelige cultivars. In perzik is bijvoorbeeld chlorogeenzuur in hoge mate aanwezig in resistente cultivars, zowel in onrijp als rijp fruit, die resistentie vertonen tegen *Monilinia* vruchtrot. Resistentie in perzik door chlorogeenzuur komt niet zozeer voort uit zijn giftigheid tegen de schimmel, maar met name uit remming van enzymen die de schimmel uitscheidt om plantenweefsel te verteren (Agrios, 2005). De meest bekende fytotoxische metabooliet van *Botrytis* is de sesquiterpene Botrydial (Williamson, 2007). Wellicht dat de metabooliet cafeïnezuur (een vergelijkbare stof als chlorogeenzuur) zoals deze in pottomaat werd aangetroffen hiervoor ook aanknopingspunten geeft. Het onderzoek op moleculair niveau liet zien dat tomaat en gerbera genetisch sterk van elkaar verschillen. Een qPCR met primers van tomaat pathogeen gerelateerde genen in gerbera leverde namelijk geen producten op. Next Generation Sequencing direct op gerbera liet echter wel zien dat dezelfde genen als in tomaat worden beïnvloed na infectie met *Botrytis*. Aangezien Next Generation Sequencing de afgelopen jaren steeds goedkoper is geworden, is het daarom ook verstandiger om direct op het gewas van interesse te sequencen. Recent is door NSure een selectie van tomaat pathogeen gerelateerde genen getest op de tomatencultivar Komeett en deze bleken bruikbaar om een vroege infectie van *Botrytis* op te sporen. Een moleculaire test om cultivars van tomaat of gerbera te screenen op hun gevoeligheid voor *Botrytis* lijkt daarmee binnen handbereik te komen. NSure heeft op dit moment al moleculaire testen op de markt die gebruikt kunnen worden in meerdere cultivars.

7.4 Activatie van bladeren werkt door in bloem

Opvallend bij de biotoetsen met gerberaplanten is dat het lokaal behandelen van één blad doorwerkt naar vermindering van gevoeligheid van bloemen voor *Botrytis* infectie met zelfs 50%. Dit is sporadisch gerapporteerd in wetenschappelijke publicaties, maar nu voor het eerst ook in een relevant sierteeltgewas als gerbera aangetoond. Tevens biedt dit perspectief tegen de inzet van andere ziekten die bloemen belagen, wellicht ook tegen vruchtrotsziekten in vruchtgroenten, zoals *Fusarium* of *Mycosphaerella* vruchtrot. Met de nieuwe methodieken om ziekten te toetsen en vroegtijdig te screenen liggen hier wellicht nieuwe mogelijkheden open die eerder niet binnen bereik waren. Tegelijkertijd is de reactiesnelheid van de plant op de chemische activator ook opvallend. Binnen één week tijd laten de bloemen die al volgroeid aan de plant zaten het effect zien van een verminderde gevoeligheid. Eerder was het beeld dat men planten en de bloemen moet beïnvloeden in een jong stadium voordat ze volgroeid zijn. Hierin komt nadrukkelijk het voordeel van activatie van systemische afweerresponsen naar voren: er hoeft geen opname van veel actieve stof plaats te vinden, maar het is mogelijk om, via een signaalstof in de plant, in onbesmette bloemdelen in een versneld tempo en in hogere mate afweereiwitten (proteasen) aan te maken. Hiermee kan ook verklaard worden dat zelfs volgroeide bloemen nog steeds in staat zijn om te reageren op de signaalstof jasmonzuur, die binnen enkele dagen (zelfs binnen enkele uren) geactiveerd wordt.

7.5 Negatieve interactie SA en JA?

In tomaat lijken we een aanwijzing te zien voor de negatieve interactie tussen de salicylzuur en de jasmonzuurroute. Dit is vooral te zien bij de start van een infectie: hier zien we namelijk een toename van de ontwikkelde lesies bij INA-behandelde planten ten opzichte van de onbehandelde planten. Toch is de doorgroei beperkter en lijkt deze toch enigszins te worden geremd door een voorbehandeling met INA. Ook bij de bloeminfecties van gerbera lijkt de INA behandeling de infecties niet te verergeren. Uit de literatuur is bekend dat INA onafhankelijk van de signaalstof salicylzuur een systemische respons kan bewerkstelligen die resulteert in de verhoogde aanmaak van PR eiwitten (proteasen), zoals glucanases in het blad (Davies 2007). In de praktijk zal er wel getoetst moeten worden of hier geen risico ligt voor producten die een sterke SAR respons geven en daardoor de gevoeligheid voor Botrytis juist kunnen vergroten. Uit eerdere testen, bijvoorbeeld bij beheersing van Botrytis in cycloam, lijkt dit namelijk wel naar voren te komen (Hofland-Zijlstra *et al.* 2013, 2012).

7.6 Veelbelovende, nieuwe merkers gevonden met moderne – omics technologieën.

De resultaten van de transcriptomics en metabolomics analyses laten zien dat het goed mogelijk is om indicatoren (zowel genen als metabolieten) te selecteren die mogelijk direct betrokken zijn bij de weerbaarheid van de plant tegen necrotrofe organismen, zoals Botrytis, in zowel tomaat als gerbera. Verhoogde accumulatie van dergelijke indicatoren onder gecontroleerde klimaatcondities kan een verhoogde staat van paraatheid van de plant aangeven. Een combinatie van toename (zowel kort als lang respons) en afname van dergelijke marker genen en/of metabolieten zou in de toekomst in de praktijk ingezet worden om planten te screenen op de aanwezigheid van een infectie.

Op basis van de bevindingen met de genenscreening lijken JA-specifieke genen kort geïnduceerd te worden na infectie in tomaat, terwijl INA-geïnduceerde genen een langdurige activiteit na infectie vertonen. In tomaten planten die voorbehandeld waren met JA bleek de gevoeligheid voor Botrytis verminderd te zijn. Het feit dat de JA-specifieke genen na infectie ook tijdelijk werden geïnduceerd in zowel de controle als de INA-behandelde planten geeft aan dat deze genen direct betrokken kunnen zijn bij Botrytis infectie en mogelijk ook bij de plant weerstand tegen Botrytis. Wellicht kan de weerbaarheid tegen Botrytis nog verder verhoogd worden als deze JA-gerelateerde genen constitutief verhoogd tot expressie kunnen worden gebracht.

7.7 Perspectieven

Dit onderzoek heeft nieuwe genen en plantmetabolieten in pottomaat en potgerbera naar voren gebracht die niet eerder beschreven staan in bekende databanken. Hierdoor zijn nieuwe wegen geopend om op een alternatieve manier uitgangsmateriaal in de sierteelt te beoordelen op Botrytis gevoeligheid. Maar ook om effecten van teelt- en klimaatmaatregelen op natuurlijke afweerreacties in tuinbouwgewassen te toetsen - onafhankelijk van klimaatcondities. De betrouwbaarheid zal toenemen als dit in meerdere onafhankelijke proeven bevestigd gaat worden, in meer verschillende gewassen en met verschillende Botrytis stammen. Doorontwikkeling van deze kennis is essentieel om versneld grote sprongen te kunnen maken in het samenstellen van effectieve duurzame beheersstrategieën tegen Botrytis.

8 Aanbevelingen

Vervolgonderzoek is nodig ter bevestiging van de robuustheid van potentiële Botrytis merkers in meerdere onafhankelijke proeven met meer verschillende gewassen en met verschillende Botrytis stammen. Tevens dient verdere karakterisatie plaats te vinden van die metabolieten en genen die betrouwbaar en reproduceerbaar veranderen door Botrytis-infectie of chemische voorbehandeling om inzicht te krijgen in hun rol in plant-pathogeen interacties, en in de mogelijkheid om deze genen en metabolieten in de toekomst als praktische biomarkers in de sierteelt te kunnen gebruiken.

De potentiële merkermetabolieten en genen kunnen in de toekomst ingezet worden bij ziekten waar alleen kwantitatieve resistentie voor beschikbaar is (Botrytis) dienen als aanvullend hulpmiddel bij het selecteren van uitgangsmateriaal om tolerante van gevoelige cultivars te onderscheiden.

De nieuwe merkerstoffen en genen kunnen daarna in vervolgstudies ook getest worden tegen andere necrotrofe ziekteverwekkers dan Botrytis, waar tegen een plant zich ook via systemische resistentie verweerd. Hierbij kan gedacht worden aan schimmels als Phytophthora, Pythium, Mycosphaerella en Fusarium. Maar wellicht ook tegen floëemzuigende insecten, waarbij jasmonzuur ook een rol kan spelen.

De nieuwe merkerstoffen en -genen zijn daarna ook mogelijkwerwijs in te zetten om stresscondities te testen die planten ondervinden als gevolg van teeltomstandigheden zoals CO₂, licht, zout/meststoffen, etc. Dit kan inzicht opleveren omtrent de effecten van deze klimaatfactoren op de potentie van een plant om paraat te kunnen staan tegen zijn belagers.

In vervolgstudies is het dan ook aan te bevelen om op basis van deze nieuwe merkerstoffen en -genen de systemische plantafweerreacties als gevolg van een combinatie van natuurlijke gewasbeschermingsproducten en plantversterkende producten kwantitatief in kaart te brengen, zodat effectieve combinaties eerder zijn op te sporen en toe te passen.

Verscheidende weerbare substraten en groeimedia met daarin niet-pathogene bacteriën zijn eveneens te testen op hun activerende rol in het stimuleren van jasmonzuurroutes en de werking tegen bovengrondse ziekten en plagen.

In sierteeltgewassen kan een soortgelijke studie met chemische activators worden uitgevoerd maar dan blootgesteld aan een biotrofe schimmel zoals meeldauw of soorten die vruchtrot veroorzaken (Fusarium, Mycosphaerella).

9 Literatuur

- Agrios, G.N (2005)
Plant Pathology, fourth edition. Academic Press. USA.
- Bari, R., J.D. Jones (2009)
Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* 69(4):473-88.
- Cerrudo I., Keller, M.M., Cargnel M.D., Demkura P.V., De Wit M., Patitucci M.S., Pierik R., Pieterse C.M., Ballaré C.L. (2012)
Low red/far-red ratios reduce Arabidopsis resistance to Botrytis cinerea and jasmonate responses via a COI1-JAZ10-dependent, salicylic acid-independent mechanism. *Plant Physiology* 158(4):2042-52.
- Davies, P.J (2007)
Plant hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.
- De Wit, M. (2012)
Neighbour detection and pathogen defence during competition for light. Proefschrift Universiteit van Utrecht.
- DelipoulosT., P.S. Kettlewell, M.C. Hare (2010)
Fungal disease suppression by inorganic salts: A review. *Crop Protection* 29 1059-1075.
- Dik, A., J.P. Wubben (2007)
Epidemiology of Botrytis cinerea diseases in greenhouses. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Eds: Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, N. Delen. Springer Nederland. pp. 319-333.
- Hofland-Zijlstra, J.D., L.S. Stevens (2012)
'Rooie led' verhoogt de afweer, licht en het effect op meeldauw. *Boom in Business*, januari. P. 18-21.
- Hofland-Zijlstra, J.D., Vries, R.S.M. de, Wensveen, W. van (2012)
Beheersing van Botrytis in cycloam : effectiviteit van biologische producten, plantversterkende meststoffen en voedingsbehandelingen tegen Botrytis in cycloam bij verschillende teelttemperaturen. PT rapport.
- Hofland-Zijlstra, J.D., Köhl, J. & S. Böhne (2009)
Preventieve en curatieve bestrijding van Botrytisstengelaantasting in tomaat met chemische en niet-chemische middelen. Wageningen UR Glastuinbouw. Productschap Tuinbouw. GTB rapport 232 .
- Hofland-Zijlstra, J.D., R.S.M de Vries, R. van den Broek (2014)
Beheersing van Botrytis in potplanten (pilotgewas cycloam). Productschap Tuinbouw. GTB rapport 1320 .
- Köhl, J. (1998)
Biological control of Botrytis cinerea in cyclamen with Ulocladium atrum and Gliocladium roseum under commercial growing conditions. *Phytopathology* 88: 568-575.
- Köhl, J. & J. P. Wubben.
Risicoschatters voor Botrytis. Parapluplan Gerbera "Beheersing van Botrytis door efficiënter energiegebruik". PT/LNV rapport.
- Os, E.A. van; Hofland-Zijlstra, J.D., Hamelink, R., Leeuwen, G.J.L. van (2010)
Parapluplan Gerbera "Beheersing van Botrytis door efficiënter energiegebruik": Bestrijding van Botrytis in gerbera tijdens de teelt en in de na-oogstfase: Deelproject 4 van Parapluplan Gerbera: kasklimaat, energie en Botrytis bij gerbera; oorzaak, verband en maatregelen. PT/LNV rapport.
- Pieterse, C. M. J., A. Leon-Reyes, S. Van der Ent & S.C M Van Wees (2009)
Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5, 308 – 316.
- Williamson, B., B. Tudzynski, P. Tudzynski, J.A.L. van Kan (2007)
Botrytis cinerea: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* 8: 561–580.
- Wubben, J.P., Bosker, A.I., Lanser, C., Dik, A.J. (2004)
Mogelijkheden voor geïntegreerde bestrijding van Botrytis in potplanten; Teeltmaatregelen en gewasbeschermingsmiddelen van natuurlijke oorsprong. PT rapport 41101667.

Bijlage I. Salicylzuur biosynthese

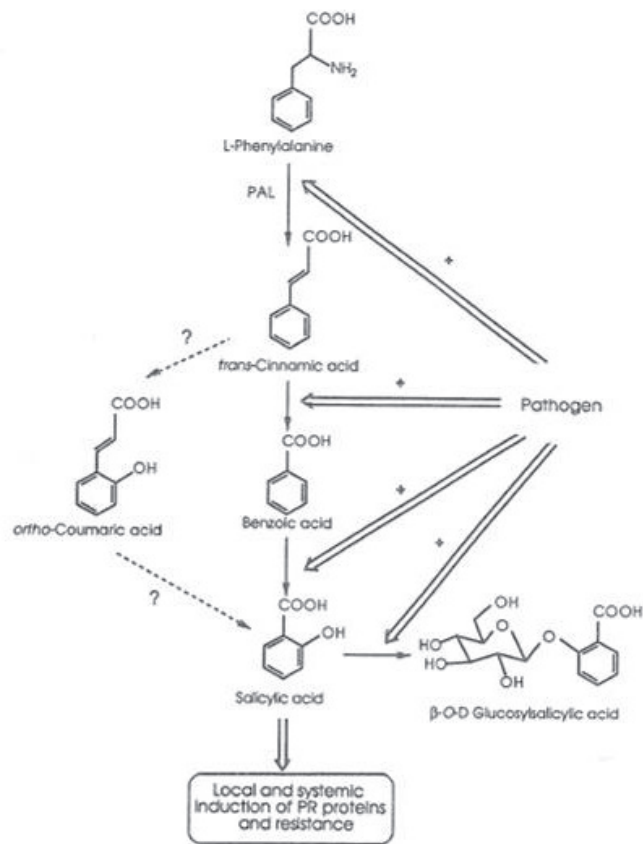


Fig. 8. Salicylic acid biosynthesis and metabolism in plants. Plus signs indicate steps induced in the vicinity of hypersensitive response lesions. From (63)

Bron: Davies, 1995.

Bijlage II. Jasmonzuur biosynthese

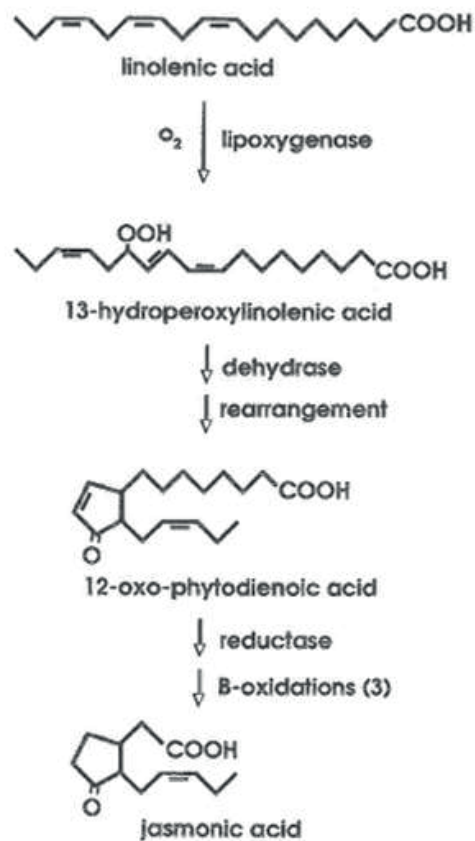


Fig. 1. Pathway for jasmonic acid biosynthesis in plants.

Bron: Davies, 1995.

To explore
the potential
of nature to
improve the
quality of life



Wageningen UR Glastuinbouw
Postbus 20
2665 ZG Bleiswijk
Violierenweg 1
2665 MV Bleiswijk
T +31 (0)317 48 56 06
F +31 (0) 10 522 51 93
www.wageningenUR.nl/glastuinbouw

Glastuinbouw Rapport GTB-1328

Wageningen UR Glastuinbouw initieert en stimuleert de ontwikkeling van innovaties gericht op een duurzame glastuinbouw en de kwaliteit van leven. Dat doen wij door toepassingsgericht onderzoek, samen met partners uit de glastuinbouw, toeleverende industrie, veredeling, wetenschap en de overheid.

De missie van Wageningen UR (University & Research centre) is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen UR bundelen 9 gespecialiseerde onderzoeksinstituten van stichting DLO en Wageningen University hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 6.000 medewerkers en 9.000 studenten behoort Wageningen UR wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.