

De genetica van grauwe schimmelresistentie in tomaat

Richard Finkers

Op 3 april 2007 promoveerde Richard Finkers aan Wageningen Universiteit op het proefschrift getiteld 'The genetics of *Botrytis cinerea* resistance in tomato'. Promotor was Prof. Dr. R.G.F. Visser van de leerstoelgroep Plantenveredeling. Co-promotoren waren Dr. Ir. A.W. van Heusden, van de leerstoelgroep Plantenveredeling en Dr. J.A.L. van Kan van de leerstoelgroep Fytopathologie, Wageningen Universiteit. Het onderzoek werd uitgevoerd bij de leerstoelgroep plantenveredeling en gefinancierd door STW, De Ruiter Seeds en de leerstoelgroep Plantenveredeling. De volledige tekst van het proefschrift is terug te vinden op: <http://edepot.wur.nl/16468>

Inleiding

De grauwe schimmel, *Botrytis cinerea* Pers:Fr (teleomorf: *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel), is een necrotrofe pathogene schimmel die infecties kan veroorzaken in ten minste 235 plantensoorten (Elad *et al.*, 2004; Jarvis, 1977). *B. cinerea* is één van de belangrijkste belagers van de tomaat (*Solanum lycopersicum*) in Noordwest-Europese teelten in kassen (Maris, 2007). Normaal gesproken beperken infecties van *B. cinerea* in tomaat zich tot de stengel (Dik en Wubben 2004; Shtienberg *et al.*, 1998). Stengelrot ontwikkelt zich meestal na het verwijderen van de onderste bladeren of van de dieven (Verhoeff, 1968), wat resulteert in lagere opbrengst of het voortijdig afsterven van de plant. Spuiten van fungiciden (Leroux, 2004) of toepassen van biologische bestrijding zijn veelgebruikte methoden om *B. cinerea*-infecties te voorkomen (Elad & Steward, 2004). *B. cinerea* heeft echter resistentie ontwikkeld tegen veel van deze beheersmethodieken (Elad & Steward, 2004; Leroux, 2004). Het ontwikkelen van *B. cinerea*-resistente cultivars, door middel van het inkruisen van resistentie allelen uit wilde verwanten van tomaat, kan een effectief alternatief zijn.



Figuur 1. Stengelrot

Bronnen voor resistentie tegen *B. cinerea* in tomaat

Resistentie tegen *B. cinerea* is gevonden in wilde verwanten van tomaat (Egashira *et al.*, 2000; Nicot *et al.*, 2002; ten Have *et al.*, 2007; Urbasch, 1986) en deze resistentie was meestal kwantitatief. Het doel van dit promotieonderzoek was om kwantitatieve loci (QTLs) te identificeren die bijdragen aan resistentie tegen *B. cinerea*. Vatbaarheid voor *B. cinerea* is bepaald met een kwantitatieve stengelttoets (Have *et al.*, 2007) en op basis van deze resultaten zijn twee resistente wilde tomaten-accessies geselecteerd voor verder onderzoek, namelijk *S. habrochaites* LYC4 en *S. neorickii* G1.1601.

Onderzoeksstrategie voor identificeren van *B. cinerea*-resistentie-QTLs

Tijdens het onderzoek zijn er twee strategieën toegepast om de locatie van genen die bijdragen aan resistentie tegen *B. cinerea* te achterhalen. De eerste strategie was er op gericht om de locatie van resistentiegenen te bepalen in tijdelijke (i.e. F₂/F₃) karteringspopulaties met behulp van DNA-merkertechnologie. Drie QTLs afkomstig uit *S. habrochaites* LYC4 (Finkers *et al.*, 2007a) en drie QTLs afkomstig uit *S. neorickii* G1.1601 (Finkers *et al.*, 2008) zijn gevonden na analyse van resistentie m.b.v. de kwantitatieve stengeltoets. Het was waarschijnlijk dat we in deze tijdelijke karteringspopulaties nog niet alle gebieden hadden geïdentificeerd, die bijdragen aan *B. cinerea*-resistentie. Daarom is er gekozen om een tweede strategie toe te passen. Een populatie van introgressie-lijnen (IL) is krachtiger voor de detectie van QTLs dan tijdelijke karteringspopulaties (Zamir, 2001). Voor het ontwikkelen van een IL populatie, worden de cultuurtomaat en de wilde soort met elkaar gekruist, waarna het kruisingsresultaat herhaaldelijk wordt teruggekruist met de cultuurtomaat. Het resultaat is een aantal lijnen die grotendeels bestaan uit genetisch materiaal van cultuurtomaat, met daarin kleine fragmenten (gedeeltes van chromosomen) van de wilde soort. Met behulp van DNA-merkertechnologie kan gekozen worden welk fragment van de wilde soort ingekruist wordt. Via deze strategie is de *S. habrochaites* LYC4-IL-populatie ontwikkeld (n=30; Finkers *et al.*, 2007b). De DNA-merkers tonen aan dat in de meeste lijnen één introgressie-fragment uit *S. habrochaites* LYC4 is ingekruist in de genetische achtergrond van *S. lycopersicum* cv. Moneymaker. Vatbaarheid voor *B. cinerea* in de IL-populatie is bepaald in een kasproef. Naast de drie eerder geïdentificeerde QTLs werden zeven extra QTLs voor *B. cinerea*-resistentie geïdentificeerd in deze populatie (Finkers *et al.*, 2007b). De IL-aanpak is dus zinvol geweest om inzicht te verkrijgen in de genetica van de complexe resistentie tegen *B. cinerea*. De ontwikkelde IL-populatie is een krachtig gereedschap voor verdere studies waarin het resistentiemechanisme van de afzonderlijke QTLs ontrafeld kan worden.

Combineren van *B. cinerea*-resistentie-QTLs

Geen van de afzonderlijke QTLs resulteerde in een niveau van resistentie dat overeen kwam met de resistente ouder *S. habrochaites* LYC4. Dit betekent dat QTLs gecombineerd zullen moeten worden om *B. cinerea*-resistente tomaten



Figuur 2. Ziektetoets voor *Botrytis*.

te verkrijgen. In onze experimenten hebben we voorbeelden gezien van QTL-combinaties die additief werken, maar ook van QTL-combinaties die een interactie vertonen waardoor het effect van de QTL-combinatie minder was dan wat verwacht werd op basis van het effect van elk afzonderlijk QTL (Finkers *et al.*, 2007a). Sommige QTLs zijn waarschijnlijk overvloedig. De *S. habrochaites* LYC4-IL-populatie is geschikt voor het maken van gecontroleerde kruisingen tussen QTL-bevattende ILs. Nakomelingen van deze kruising, geselecteerd met DNA-merkers op de aanwezigheid van de gewenste QTLs, kunnen getest worden op resistentie tegen *B. cinerea* om te bepalen welke en hoeveel QTLs minimaal ingekruist moeten worden om een redelijk tot hoog niveau van resistentie te verkrijgen.

Veredeling van *B. cinerea*-resistentie tomatencultivars

Het veredelen voor *B. cinerea*-resistente cultivars wordt lastiger naarmate er meer resistentie-gebieden ingekruist moeten worden. De ontwikkelde DNA-merkers zullen dit proces eenvoudiger maken. Eén resistente terugkruisingslijn is ingeteeld en bevat drie homozygote introgressie-fragmenten van de wilde ouder, *S. habrochaites* LYC4. Het resistentieniveau van deze inteeltlijn (BRC5) was in de kastoetsen vergelijkbaar met dat van LYC4. Twee van de introgressie-fragmenten, in BRC5, bevatten QTLs die betrokken zijn bij *B. cinerea*-resistentie. Onze hypothese is dat het hoge niveau van resistentie in BRC5 waar-

PROMOTIE

schijnlijk veroorzaakt wordt door de (inter) actie van slechts twee of drie QTLs (Finkers *et al.*, 2007b).

Perspectief

Deze studie heeft aangetoond dat er een genetische basis is voor resistentie tegen *B. cinerea*. Dankzij de ontwikkelde DNA-merkers kunnen de geïdentificeerde chromosoomfragmenten met resistentiegenen nu gericht ingekruist worden. De verwachting is nu dat dit in de nabije toekomst zal leiden tot nieuwe, *B. cinerea*-resistente, tomatencultivars.

Literatuur

- Dik AJ & Wubben JP (2004) *Botrytis* epidemiology in greenhouses. In: Elad Y, Williams B, Tudzynski P & Delen N (eds.) *Botrytis*: biology, pathology and control. Kluwer, Dordrecht, pp 319-333
- Egashira H, Kuwashima A, Ishiguro H, Fukushima K, Kaya T & Imanishi S (2000) Screening of wild accessions resistant to gray mold (*Botrytis cinerea* Pers.) in *Lycopersicon*. *Acta Physiologiae Plantarum* 22: 324-326
- Elad Y & Steward A (2004) Microbial control of *Botrytis* spp. In: Elad Y, Williams B, Tudzynski P & Delen N (eds.) *Botrytis*: biology, pathology and control. Kluwer, Dordrecht, pp 223-241
- Finkers R, Berg P van den, Berloo R van, Have A ten, Heusden AW van, Kan JAL van & Lindhout P (2007a) Three QTLs for *Botrytis cinerea* resistance in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 114:585-593
- Finkers R, Heusden AW van, Meijer-Dekens F, Kan JAL van, Maris P & Lindhout P (2007b) The construction of a *Solanum habrochaites* LYC4 introgression line population and the identification of QTLs for resistance to *Botrytis cinerea*. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 1071-1080
- Finkers R, Bai Y, Berg P van den, Berloo R van, Meijer-Dekens F, Have A ten, Kan JAL van, Lindhout P & Heusden AW van (2008) Quantitative resistance to *Botrytis cinerea* from *Solanum neorickii*. *Euphytica* 159: 83-92
- Have A ten, Berloo R van, Lindhout P & Kan JAL van (2007) Partial stem and leaf resistance against the fungal pathogen *Botrytis cinerea* in wild relatives of tomato. *European Journal of Plant Pathology* 153-166
- Jarvis WR (1977) *Botryotinia* and *Botrytis* species: taxonomy, physiology, and pathogenicity: a guide to the literature. Monograph 15
- Leroux P (2004) Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P & Delen N. *Botrytis*: Biology, pathology and control. pp: 195-217
- Maris P (2008) De Ruiter Seeds. *Gewasbescherming* 38: 289-290
- Nicot PC, Moretti A, Romiti C, Bardin M, Caranta C & Ferrière H (2002) Differences in susceptibility of pruning wounds and leaves to infection by *Botrytis cinerea* among wild tomato accessions. *Report of the Tomato Genetics Cooperative* 52: 24-26
- Shtienberg D, Elad Y, Niv A, Nitzani Y & Kirshner B (1998) Significance of leaf infection by *Botrytis cinerea* in stem rotting of tomatoes grown in non-heated greenhouses. *European Journal of Plant Pathology* 104: 753-763
- Verhoeff K (1963) Studies on *Botrytis cinerea* in tomatoes. Effect on soil nitrogen level and methods of deleafing upon the occurrence of *Botrytis cinerea* under commercial conditions. *European Journal of Plant Pathology* 74: 184-194
- Urbach I (1986) Resistenz verschiedener Kultur- und Wildtomatenpflanzen (*Lycopersicon* spp.) gegenüber *Botrytis cinerea* Pers. *Journal of Phytopathology* 116: 344-351

PROMOTIE

Beurzen KNPV

Het KNPV-bestuur verleent van tijd tot tijd subsidies om activiteiten mogelijk te maken die passen in de doelstelling van de vereniging.

Randvoorwaarden voor de toekenning:

- indienen gemotiveerd verzoek: wat, met welk doel, welke kosten, wie financiert en wat wordt teruggeleverd (het aanvraagformulier is te downloaden van website www.knpv.org);
- passen binnen de doelstelling van de vereniging, c.q. bevorderen samenwerking en/of kennisuitwisseling op gebied van gewasbescherming;
- ingediend kan worden door individuele personen mits KNPV lid, verenigingen, (KNPV-) werkgroepen en maatschappelijke organisaties;
- de gevraagde financiële bijdrage zou niet logischerwijs door de werkgever betaald moeten worden (om dit te beoordelen inzicht geven in medefinanciering en/of eigen bijdrage);
- er wordt een tastbare tegenprestatie gevraagd, bijvoorbeeld een korte rapportage voor Gewasbescherming (plaatsing ter bepaling van redactie) of een poster op een gewasbeschermingsdag;
- een pre hebben voorstellen die samenwerking tussen de groepen onderzoek, onderwijs, industrie en beleid bevorderen.

Aanvraagformulieren kunt u vinden op www.knpv.org. De aanvraag wordt beoordeeld door een toetsingscommissie.