

De rol van ethyleenperceptie in resistentie tegen plantenziekten

Bart P.J. Geraats

Op 17 maart 2003 promoveerde Bart P.J. Geraats aan de Universiteit Utrecht op het proefschrift getiteld 'The role of ethylene perception in plant disease resistance'. Dit onderzoek maakte deel uit van een door ALW gefinancierd programma met de titel "The role of ethylene perception in acclimation to the biotic environment of plants: adjustment of growth during crowding and defense against opportunistic pathogenic microorganisms". Promotor was Prof. Dr ir L.C. van Loon en copromotor Dr P.A.H.M. Bakker, beiden werkzaam bij de leerstoelgroep Fytopathologie van de Universiteit Utrecht.

Ethyleen in planten

Gasvormig ethyleen is als hormoon werkzaam in planten. Het wordt door verschillende planteweefsels geproduceerd en reguleert diverse processen tijdens groei en ontwikkeling, zoals zaadkieming, stengel- en wortelgroei, bloei, en het rijpen van vruchten. Ethyleen is ook betrokken bij de reactie van planten op verschillende vormen van stress, zoals insectenvraat en infectie door ziekteverwekkers. De rol van ethyleen bij de interactie tussen planten en ziekteverwekkers is niet eenduidig. Blootstelling van planten aan ethyleen vóór infectie kan ziekteresistentie induceren, maar behandeling met ethyleen tijdens het infectieproces kan de ziektesymptomen juist verergeren.

Ethyleen-ongevoelige tabak vatbaar voor opportunistische *Pythium spp.*

Eerder was gevonden dat tijdens de overgevoeligheidsreactie van

tabak op tabaksmozaïekvirus (TMV) sterke ethyleenproductie plaatsvindt rond het moment van verschijnen van necrotische lesies. Om de rol van ethyleen nader te bestuderen, werden planten van de cultivar Samsun NN genetisch gemodificeerd (Tetr) met het dominante, mutante gen *etr1-1* uit *Arabidopsis thaliana* (zandraket), dat codeert voor een defect ethyleenreceptor-eiwit. Dit resulteerde in ongevoeligheid van de transgene Tetr planten voor het hormoon. Wanneer deze Tetr tabakplanten in gewone potgrond opgekweekt werden, ontwikkelden ze spontaan symptomen van verwelking en stengelrot, doordat hun wortels geïnfecteerd werden door opportunistische ziekteverwekkende micro-organismen in de grond. Controleplanten die niet genetisch gemodificeerd waren, ontwikkelden geen ziektesymptomen. Uit de stengels van geïnfecteerde Tetr planten werden verschillende schimmels en oömyceten (schimmelachtige micro-organismen) geïsoleerd. Wanneer één van deze oömyceten, *Pythium sylvaticum*, geïnoculeerd werd op niet-zieke Tetr planten die groeiden in grond die was gesteriliseerd door auto-

claveren, veroorzaakte dit dezelfde ziektesymptomen, terwijl niet-gemodificeerde planten gezond bleven. Deze resultaten lieten zien dat de ethyleenongevoelige Tetr planten vatbaar zijn voor infectie door *P. sylvaticum*, terwijl niet-gemodificeerde tabak dat schijnbaar niet is.

In eerste instantie werd onderzocht in hoeverre andere in potgrond aanwezige micro-organismen eveneens ziekte kunnen veroorzaken in Tetr planten en of Tetr planten ook gevoeliger zijn voor verschillende bekende ziekteverwekkers van tabak. Bovendien werd nagegaan of Tetr planten beschermd kunnen worden tegen opportunistische ziekteverwekkers in de bodem door behandelingen waarvan bekend is dat ze resistentie in planten induceren, of met bacteriën die met ziekteverwekkers kunnen concurreren of ze remmen in hun activiteit.

Bodempathogenen van ethyleen-ongevoelige tabak en *Arabidopsis*

Uit spontaan ziek geworden Tetr planten konden verschillende schimmels (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizopus stolonifer*, *Thielaviopsis basicola*) en oömyceten (*Pythium* soorten) worden geïsoleerd. Al deze isolaten veroorzaakten ziekte in Tetr tabak wanneer ze geïnoculeerd wer-

PROMOTIE

den op planten van zes weken oud die in geautoclaveerde grond groeiden. Niet-gemodificeerde controleplanten van dezelfde leeftijd ontwikkelden nooit ziektesymptomen wanneer ze op dezelfde manier geïnoculeerd werden. Echter, wanneer niet-gemodificeerde zaailingen van slechts twee weken oud werden geïnoculeerd, bleken zij wel vatbaar voor verschillende isolaten van *Pythium* en *T. basicola*. Niettemin werden Tetr zaailingen zieker dan niet-gemodificeerde zaailingen. Ook in *Arabidopsis* bleken ethyleen-ongevoelige mutanten vatbaarder te zijn voor *Pythium* en *T. basicola* dan normaal ethyleengevoelige controleplanten. Deze resultaten duiden erop dat ongevoeligheid voor ethyleen tot eenzelfde verstoring van resistentie leidt in tabak en in *Arabidopsis*.

Bovendien werd aangetoond dat Tetr tabaksplanten meer groei van *Pythium* toelaten dan niet-gemodificeerde tabak. Wanneer planten met even ernstige symptomen met elkaar werden vergeleken, bevatten de stengels van Tetr planten meer *Pythium* dan die van niet-gemodificeerde planten. Deze conclusie werd gebaseerd op de aanwezigheid van grotere hoeveelheden ribosomaal 5,8S RNA dat specifiek is voor *Pythium* in de Tetr planten. Blijkbaar zijn Tetr planten niet alleen gevoeliger voor ziekte veroorzaakt door *Pythium*, maar laten ze ook verhoogde stengelkolonisatie door deze oömyceet toe.

Moleculaire analyse van de wortel-microflora van tabak

Veel micro-organismen in de bodem kunnen niet geïsoleerd en gekweekt worden. Om toch een indruk te krijgen van de totale microflora op en in de plantewortel werd een moleculaire



Figuur 1. Stengelstukjes van controle (links) en Tetr tabaksplanten. De bladeren zijn volledig vergaan tengevolge van infectie door *Botrytis cinerea*. In de controleplanten stopte de groei van de schimmel bij het bereiken van de stengel, terwijl de Tetr planten volledig werden gekoloniseerd, resulterend in ernstige rot van de stengel.

benadering gebruikt, gebaseerd op een selectieve vermeerdering van een deel van het ribosomaal DNA van bacteriën, schimmels en oömyceten met behulp van de zogenaamde “polymerase chain reaction” (PCR). Het vermeerderde DNA wordt gescheiden met behulp van “denaturing” (DGGE) of “temperature” (TGGE) “gradient gel electrophoresis”, hetgeen resulteert in specifieke bandenpatronen. In principe is ieder bandje afkomstig van één micro-organisme en geeft het hele bandenpatroon een beeld van de aanwezige microbiële populatie. Met behulp van deze techniek werden de dominante micro-organismen in niet-gemodificeerde en Tetr planten, die òf in niet-geautoclaveerde òf in geautoclaveerde grond groeiden, met elkaar vergeleken.

Voordat zich spontaan ziektesymptomen ontwikkelden, bevatten de planten in niet-geautoclaveerde grond heel andere populaties bacteriën en schimmels dan planten in geautoclaveerde grond. Bij planten die in geautoclaveerde grond groeiden werden tot in een laat stadium geen oömyceten gevonden. Dit kan het uitblijven van spontane ziekteontwikkeling van Tetr planten in geautoclaveerde grond verklaren. De wortels van nog niet zieke niet-gemodificeerde en Tetr planten bevatten verschillende

populaties bacteriën en oömyceten. Wortels van niet-gemodificeerde en Tetr planten moeten daarom verschillen in morfologische en / of fysiologische eigenschappen die de ontwikkeling van diverse typen micro-organismen op het wortelstelsel beïnvloeden. Blijkbaar is de regulatie van deze eigenschappen afhankelijk van ethyleen.

Analyse van spontaan ziek geworden Tetr planten in niet-geautoclaveerde grond liet zien dat stengels van jonge planten voornamelijk door oömyceten werden gekoloniseerd, terwijl in stengels van oudere planten vooral echte schimmels aanwezig waren. Deze resultaten bevestigen de eerdere waarnemingen dat Tetr tabak in niet-geautoclaveerde grond gekoloniseerd kan worden door verschillende micro-organismen. Bovendien blijkt het type micro-organisme dat overheerst, afhankelijk te zijn van de leeftijd van de Tetr planten.

Gevoeligheid voor necrotrofe en biotrofe tabakspathogenen

Om na te gaan in hoeverre ook resistentie tegen bekende ziekteverwekkers van tabak verstoord is

PROMOTIE

Ziekteonderdrukking in ethyleen-ongevoelige tabak

door ethyleenongevoeligheid werd een aantal necrotrofe en biotrofe ziekteverwekkers getoetst op wortels en bladeren van niet-gemodificeerde en Tetr planten.

Over het algemeen bleken Tetr planten gevoeliger te zijn voor necrotrofe ziekteverwekkers, die symptomen van afsterving en rot veroorzaken, zoals de bacterie *Erwinia carotovora*, de schimmels *Botrytis cinerea*, *Cercospora nicotianae*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, en *Thielaviopsis basicola*, en enkele oömyceten (*Pythium* soorten). In tegenstelling tot de verhoogde gevoeligheid voor necrotrofe ziekteverwekkers, was de gevoeligheid van Tetr planten voor de onderzochte biotrofe ziekteverwekkers (*Oidium neolycopersici*, *Peronospora tabacina* en TMV), die levende gastheercellen nodig hebben om zich te kunnen ontwikkelen, onveranderd of zelfs lager dan van niet-gemodificeerde tabak. In overeenstemming met waarnemingen van anderen bleken ethyleenongevoelige *Arabidopsis* planten eveneens gevoeliger voor necrotrofe dan voor biotrofe ziekteverwekkers. Ethyleenongevoelige tabak en *Arabidopsis* hadden beide een verlaagde activiteit van het enzym peroxidase, dat vaak geassocieerd wordt met ziekteresistentie. Blijkbaar verstoort ethyleenongevoeligheid in tabak en *Arabidopsis* dezelfde soort afweermechanismen en resulteert dit in een verhoogde mate van ziekte door necrotrofe ziekteverwekkers.

Tenslotte werd onderzocht of de verminderde resistentie van Tetr planten gecompenseerd kan worden door behandeling met chemicaliën of bacteriën die resistentie induceren, door overexpressie van specifieke afweergenen, of door toediening van wortelkoloniserende bacteriën die ziekteverwekkers in de bodem kunnen remmen. Het bespuiten van de bladeren van Tetr tabaksplanten met γ -aminoboterzuur (BABA), benzo-(1,2,3)-thiadiazol-7-thiocarbonzuur-S-methylester (BTH), methyljasmonaat (MeJA), of salicylzuur (SA) induceerde de expressie van genen die coderen voor zogenaamde "pathogenesis-related" (PR) eiwitten. Expressie van deze genen markeert de inductie van systemische resistentie in de plant. Behandeling met BTH of SA induceerde inderdaad resistentie tegen TMV in Tetr planten. Echter, geen van de behandelingen reduceerde het optreden van spontane ziektesymptomen bij Tetr tabak in niet-geautoclaveerde grond, of ziekte na inoculatie van Tetr planten in geautoclaveerde grond met *Pythium*. Ook overexpressie van de met resistentie tegen oömyceten in verband gebrachte PR genen *PR-1g*, *PR-5c*, of beide in transgene Tetr planten verhoogde de resistentie tegen *Pythium* niet. Overexpressie van *PR-1g* leek de ziekte-

ontwikkeling enigszins te reduceren, maar het effect was klein en wisselend.

Net als toediening van resistentie inducerende chemicaliën waren ook wortelbehandelingen met bacteriën, waarvan bekend is dat ze resistentie induceren in tabak en andere plantensoorten, niet effectief: wortelkolonisatie door *Pseudomonas fluorescens* isolaat WCS417r, *Pseudomonas putida* isolaat WCS358r, of *Pseudomonas aeruginosa* isolaat 7NSK2, beschermden de Tetr planten niet tegen *Pythium*. Ook wortelbehandeling met *Bacillus cereus* isolaat UW85, *Pseudomonas fluorescens* isolaat Q8r1-96, of transgene WCS358r bacteriën die een antibioticum produceren, beschermden de Tetr planten niet tegen ziekte, hoewel al deze bacterie-isolaten de groei van *Pythium* wel remden op een agarmedium. Deze resultaten laten zien dat het heel moeilijk is om de verhoogde vatbaarheid van ethyleenongevoelige Tetr tabaksplanten terug te dringen. Blijkbaar spelen ethyleeneffecten een belangrijke rol bij ziekteresistentie van planten tegen necrotrofe pathogenen. Het oplossen van de vraag welke verdedigingsmechanismen door ethyleen gereguleerd worden is belangrijk om te kunnen begrijpen waarom ethyleen-ongevoelige planten gevoeliger zijn voor ziekte en hoe resistentie kan worden bevorderd.

PROMOTIE