

Basaal en geïnduceerd systemische resistentie tegen *Botrytis cinerea* in tomaat

K. Audenaert

Op 26 april 2002 promoveerde Kris Audenaert aan de Rijksuniversiteit van Gent op het proefschrift getiteld '*Basal and induced systemic resistance to Botrytis cinerea in tomato*'. Promotor was Prof. dr. M. Höfte, vakgroep Fytopathologie, Rijksuniversiteit Gent. Dit onderzoek werd gefinancierd door het Instituut voor de aanmoediging van Innovatie door Wetenschap en Technologie in Vlaanderen (IWT).

Inleiding

Planten beschikken over een zeer uitgebreid scala aan afweermechanismen om een infectie door pathogenen te vermijden en de schade te beperken. De rol die het plantenhormoon salicylzuur speelt in de respons van planten na pathoogeeninfectie en de ermee gepaard gaande systemisch verworven resistentie (SVR), is reeds uitgebreid bestudeerd: expressie van het bacterieel *nahG* gen, wat leidt tot conversie van salicylzuur tot catechol, leidt in veel plant-pathogeensystemen tot een gereduceerde plantafweer. Nochtans is salicylzuur niet het enige plantenhormoon dat betrokken is in signaaltransductie na pathoogenaanval. Ethyleen en jasmijnzuur zijn twee belangrijke moleculen in de afweer van planten tegen bepaalde pathogenen.

Interactie tussen *Botrytis cinerea* en tomaat

In dit werk werd een reproduceerbare, uniforme artificiële infectie ontwikkeld van *Botrytis cinerea* in tomaat. De mate van infectie van tomaat door *Botrytis cinerea* was

vooral zeer belangrijk in onderzoek naar afweer tegen dit necrotrofe pathogeen: bij een te hoge infectiedruk gaat plantafweer tegen *B. cinerea* vaak verloren omdat er voor dit pathogeen geen genom-gen herkenning optreedt en resistentie nooit absoluut is. Door gebruik te maken van dit modelinfectiesysteem in een "detached leaf assay", werd het belang van de plantenhormonen ethyleen, jasmijnzuur, abscisinezuur en salicylzuur onderzocht in de interactie van tomaat met *B. cinerea* door gebruik te maken van mutanten en transgene planten, geraakt in de biosynthese of perceptie van één van deze moleculen. Abscisinezuur is een belangrijk molecuul in tal van fysiologische processen maar zijn rol in interacties tussen plant en pathogeen werd nog niet gekarakteriseerd. Naast salicylzuur en ethyleen bleek vooral het abscisinezuur een cruciale rol te spelen in de gevoelige reactie van tomaat na infectie met *B. cinerea*: Mutante tomatenplanten met gereduceerde abscisinezuur niveau (*sitiens* cv. Moneymaker, *flacca*, *notabilis* vc. Ailsa Craig) bleken zeer resistent te zijn tegen *B. cinerea*. De reactie van deze abscisinezuur deficiënte planten na een infectie met *B. cinerea* benaderde zelfs een klassieke hypersensitiviteitsrespons (Figuur 1).

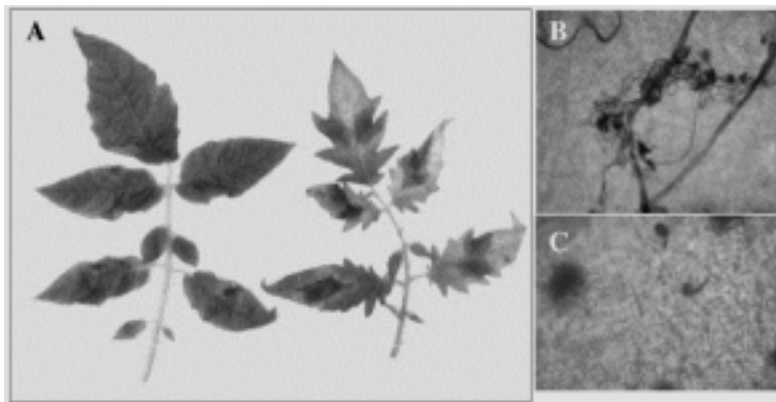
Er werd getracht om het onderliggende werkingsmechanisme van abscisinezuur met betrekking tot plantafweer in tomaat verder te karakteriseren. Hierbij werd duidelijk dat abscisinezuur de salicylzuur-afhankelijke plantafweer van tomaat moduleert. Er werd een duidelijke inductie van phenylalanine ammonia lyase (PAL) waargenomen in abscisinezuur negatieve *sitiens* planten na infectie met *B. cinerea*. Dit bleek echter niet het geval te zijn in wildtype (WT) planten. Bovendien werden *sitiens* planten overgevoelig voor het salicylzuur analoog benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothioic acid (BTH). Grenswaarden voor de inductie van *PRIa* waren tien tot honderd keer lager in *sitiens* planten vergeleken met WT planten. Onze resultaten tonen passend dat abscisinezuur (ABA) in staat is om plantafweer te onderdrukken. De zeer hoge gevoeligheid van WT tomatenplanten voor *B. cinerea* is de resultante van deze onderdrukte plantafweer.

Rol van abscisinezuur in afweer van tomaat tegen andere pathogenen

Het is reeds lang gekend dat de rol van plantenhormonen in plantafweer sterk afhankelijk is van het type pathogeen. Daarom werd er nagegaan welke rol abscisinezuur speelt in de afweer van tomaat te-

PROMOTIE

gen enkele andere pathogenen. Het werd duidelijk dat abscisinezuur belangrijk was in de interactie van tomaat met de necrotroof *Sclerotinia sclerotiorum* maar niet in de afweer tegen de biotroof *Oidium neolycopersici* of de wortelpathogeen *Pythium splendens*. Waarschijnlijk is het belang van abscisinezuur beperkt tot necrotrofen met een lage waardplant-specificiteit. Dit werk illustreert passend het differentieel belang van plantenhormonen in verschillende plant-pathosystemen.



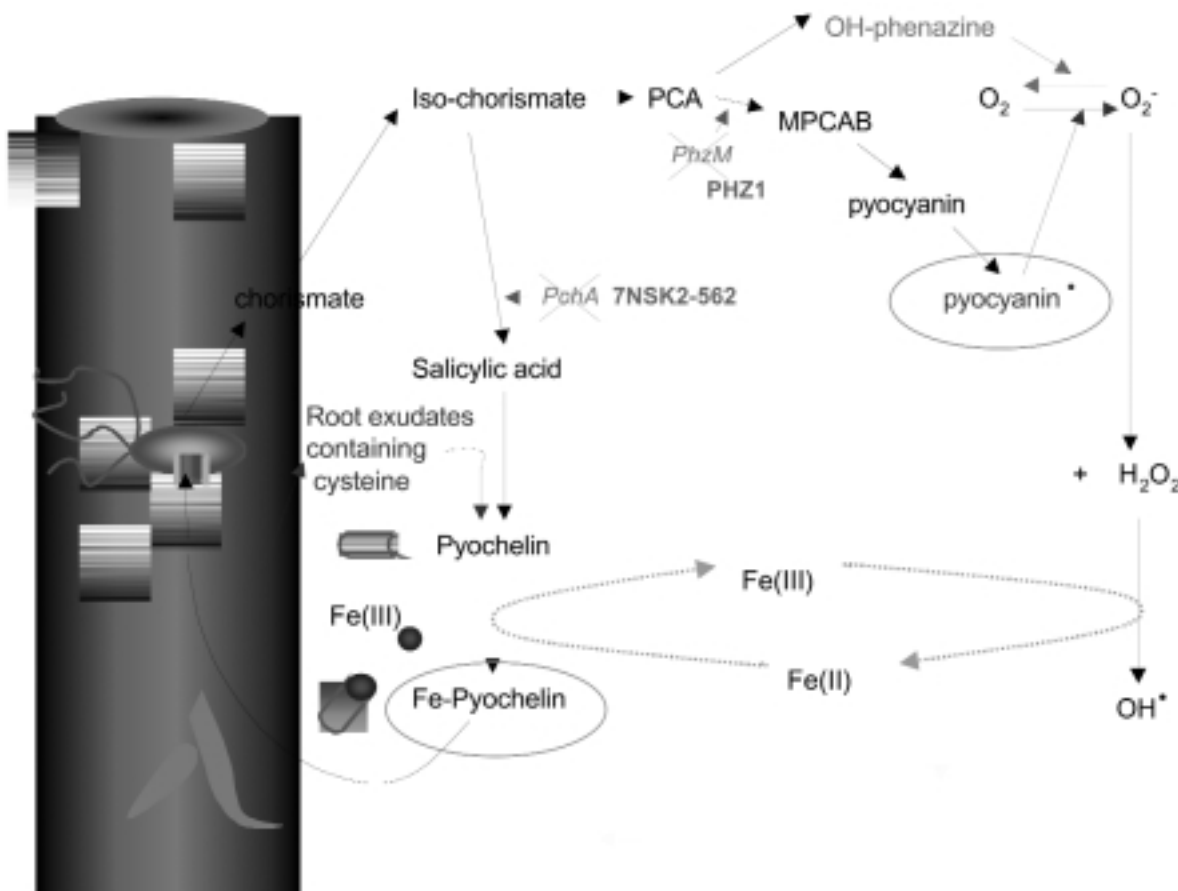
Inductie van resistentie in tomaat door *Pseudomonas*

Pathogenen zijn niet de enige die plantafweer kunnen activeren. Sommige niet-pathogene micro-organismen, voornamelijk plantengroeibevorderende rhizosfeer

bacteriën kunnen plantafweer activeren. Net zoals bij een pathogeeninfectie, induceren bepaalde bacteriën een ethyleen/jasmijnzuur-afhankelijke signaaltransductieweg terwijl andere bacteriën een salicylzuur-afhankelijke signaaltransductieweg activeren. Reeds vele studies toonden duidelijk overlappingsen tussen enerzijds pathogeen-geïnduceerde en rhizobacterie-geïnduceerde plantafweer. *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 is een bacterie die resistentie induceert in tal van plan-

ten. De bacterie produceert een aantal belangrijke secundaire metabolieten zoals de sideroforen pyocheline en salicylzuur en een fenazine nl. pyocyanine. De rol van salicylzuur bij inductie van resistentie door deze bacterie werd reeds uitgebreid bestudeerd in tal van plant-pathogeensystemen. Onder ijzerlimitatie waren salicylzuur negatieve mutanten niet in staat om resistentie te induceren. De biosynthese van pyocheline verloopt in *P. aeruginosa* via de shikimaat syntheseweg waarbij cho-

PROMOTIE



rismaat wordt omgezet naar salicylzuur dat op zijn beurt een precursor is van pyocheline. Daardoor zijn salicylzuur-negatieve mutanten ook pyocheline deficiënt en kan een rol voor pyocheline in geïnduceerde resistentie niet worden uitgesloten.

In dit werk werd het belang van pyocheline in geïnduceerde resistentie door 7NSK2 grondig bestudeerd. Aanvankelijk werden bewijzen gevonden dat salicylzuur betrokken was in geïnduceerde resistentie door 7NSK2: zowel 7NSK2 als KMPCH (een pyocheline deficiënte salicylzuur producent) induceerden resistentie in tomaat tegen *B. cinerea* in WT tomatenplanten maar niet in *nahG* planten. Bovendien waren salicylzuur-deficiënte mutanten van beide stammen niet langer in staat om resistentie te induceren. Deze bevindingen wezen erop dat salicylzuur de bacteriële determinant was die verantwoordelijk was voor de inductie van resistentie in tomaat tegen *B. cinerea* door 7NSK2 en KMPCH. Uit verder onderzoek bleek echter dat KMPCH salicylzuur produceerde op en een verhoogde PAL-activiteit induceerde in de wortels, terwijl dit niet kon worden aangetoond voor 7NSK2. Dit wees erop dat 7NSK2 het ge-

produceerde salicylzuur zeer efficiënt omzette in pyocheline. Pyocheline alleen bleek echter niet voldoende te zijn om resistentie te induceren in tomaat tegen *B. cinerea*. Een tweede molecuul bleek noodzakelijk te zijn.

Uit onderzoek naar de infectiemechanismen van humane longcellen door klinische *P. aeruginosa* isolaten bleek dat pyocheline en de fenazine component pyocyanine samen zeer reactieve hydroxyl radicalen konden genereren. Deze zuurstofverbindingen veroorzaken schade aan de long-epitheelcellen en bevorderen het infectieproces. In planten is het reeds zeer lang bekend dat reactieve zuurstofverbindingen een belangrijke rol spelen in de afweer. Om een eventuele rol van pyocyanine in de geïnduceerde resistentie door 7NSK2 te bestuderen, werd een pyocyanine deficiënte mutant gecreëerd. PHZ1 is gemuteerd in *phzM*, een gen dat codeert voor een O-methyltransferase. PHZ1 bleek niet in staat te zijn om resistentie te induceren in tomaat tegen *B. cinerea*. Complementatie voor de pyocyanine productie of co-inoculatie met mutant 7NSK2-562 (pyocheline-negatief, salicylzuur negatief, pyocyanine positief) herstelde de

geïnduceerde resistentie. Deze resultaten suggereren dat 7NSK2 resistentie induceert door een synergetische werking van pyocyanine en pyocheline en niet door de productie van salicylzuur (Figuur 2).

Conclusies en vooruitblik

Dit werk werpt een nieuw licht op de rol van plantenhormonen in afweer tegen pathogenen. Enerzijds werd het differentieel belang van verschillende plantenhormonen aangetoond in plantafweer tegen verschillende pathogenen. Bovendien werd voor het eerst het belang van abscisinezuur in de gevoeligheid van tomaat tegen necrotrofe pathogenen aangetoond. In het onderzoek naar geïnduceerde resistentie zijn we erin geslaagd om aan te tonen dat *P. aeruginosa* 7NSK2 resistentie induceert via de productie van pyocyanine en pyocheline. Gezien pyocyanine en pyocheline een rol spelen in de infectie van longcellen door klinische isolaten van *P. aeruginosa*, werd bovendien een mooi parallellisme ontdekt tussen planten en zoogdieren.

PROMOTIE