

Aspecten van seksualiteit in *Mycosphaerella*-pathogenen van tarwe en gerst: genetisch onderzoek naar specificiteit, koppeling en fungicideresistentie

Sarah Ware

Op 30 oktober 2006 promoveerde Sarah Blossom Ware aan Wageningen Universiteit op het proefschrift met de titel 'Aspects of sexual reproduction in *Mycosphaerella* species on wheat and barley: genetic studies on specificity, mapping, and fungicide resistance'. Promotor was prof. dr.ir. P.J.G.M. de Wit van het Laboratorium voor Fytopathologie. Co-promotoren waren dr.ir. ing. G.H.J. Kema van Plant Research International B.V. en dr.ir. Maarten de Waard van de leerstoelgroep Fytopathologie. Het onderzoek werd gefinancierd door Wageningen Universiteit en DLO

Inleiding

Mycosphaerella-soorten zijn haploïde ascomyceten die zeer grote opbrengstverliezen veroorzaken in onder andere granen, citrusvruchten en bananenplanten. Twee soorten binnen dit geslacht zijn *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröt (anamorph *Septoria tritici*) en *Septoria passerinii*. *M. graminicola* is de veroorzaker van Septoria bladvlekkenziekte van brood- en durumtarwe, en *S. passerinii* veroorzaakt bladvlekkenziekte in gerst. *M. graminicola* is een heterothalische schimmel met een zeer actieve seksuele cyclus, terwijl voor *S. passerinii* tot nu toe geen geslachtelijke cyclus is beschreven.

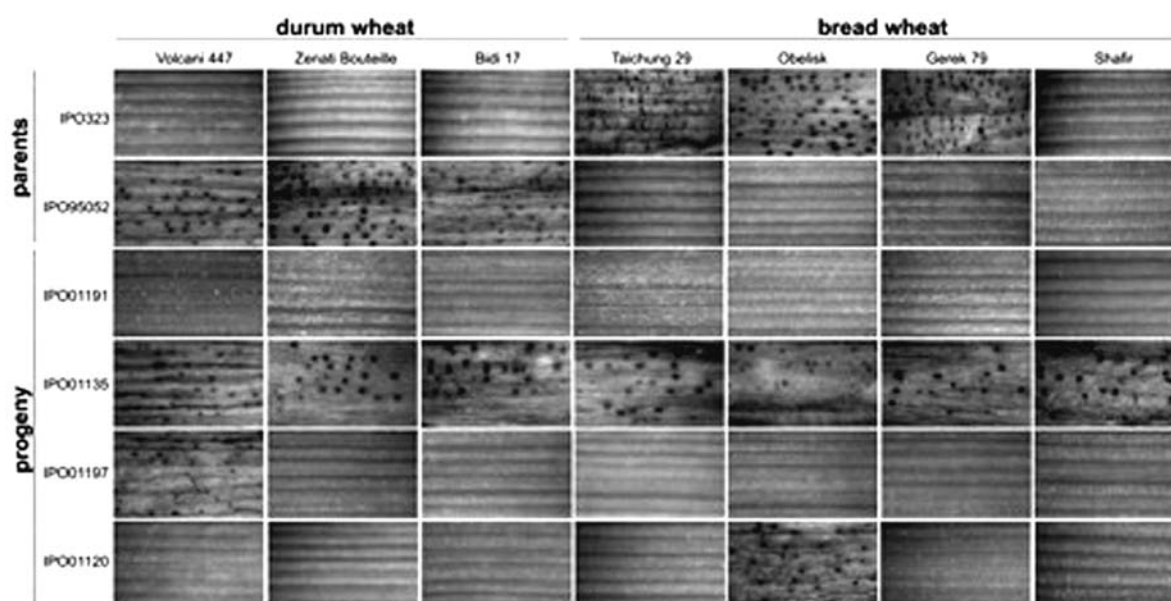
Voortplanting van avirulente isolaten

In het proefschrift wordt de *in planta* ontwikkeling van geslachtelijke nakomelingen van de pathogene tarweschimmel *M. graminicola* beschreven terwijl één van de ouders avirulent is. Wij hebben vastgesteld dat avirulente isolaten kunnen overleven en zelfs in biomassa toenemen na inoculatie van resistente tarweplanten en bovendien aan een geslachtelijke cyclus kunnen deelnemen en die voltooiën tot en met de productie van kiemkrachtige ascosporen zolang de andere ouder in de geslachtelijke cyclus een virulent isolaat betreft. Voor zover ons bekend is dit de eerste keer dat dit fenomeen is beschreven.

Genetische kaarten

In het onderzoek zijn twee hoge-dichtheid genetische koppelingskaarten geconstrueerd waarbij gebruik is gemaakt van *Diversity Arrays Technology* (DArT). De integratie van deze kaarten tot een brugkaart was mogelijk door gebruik te maken van een gezamenlijke ouder in beide kruisingen. Eén kaart werd gemaakt door de uitsplitsing van merkers in de nakomelingschap van een kruising tussen twee broodtarwe-isolaten, IPO323 en IPO94269, te bestuderen. De andere kaart is gebaseerd op de uitsplitsing van merkers in een populatie die werd verkregen uit een kruising tussen IPO323 en het durumtarwe-isolaat IPO95052. In totaal werden 1.144 merkers op de geïntegreerde kaart geplaatst. Analyse van deze kaarten liet zien dat translocaties en aneuploidie regelmatig voorkwamen in de nakomelingschappen.

PROMOTIES



Figuur 1: Virulentie-fenotypen van de *Mycosphaerella graminicola* isolaten IPO323 and IPO95052 (parents) op drie durumtarwe- en vier broodtarwecultivars en vier voorbeeld- fenotypen van isolaten uit het nakomelingschap van een kruising tussen deze isolaten (progeny).

Waardplantspecificiteit

Hoewel *M. graminicola* in zowel brood- als durumtarwe Septoria bladvlekkenziekte veroorzaakt, vertonen isolaten in natuurlijke populaties een duidelijke specificiteit voor een van deze soorten (waardplant-specificiteit). De genetische basis voor deze waardplantspecificiteit in *M. graminicola* is onderzocht in de nakomelingen (N=163) van de kruisingen tussen het Nederlandse broodtarwe-isolaat IPO323 en het Algerijnse durumtarwe-isolaat IPO95052. De fenotypering van zowel op broodtarwe als op durumtarwe verkregen nakomelingen werd uitgevoerd op zeven differentiërende tarwerassen. Hieruit bleek dat deze isolaten pathogeen waren op individuele brood- en/of durumtarwe rassen, maar dat er ook isolaten zijn die geen van de getoetste rassen kunnen aantasten (Figuur 1). Deze resultaten zijn gebruikt om negen quantitative trait loci (QTLs) op zeven koppelingsgroepen van de hoge-dichtheid

genetische koppelingskaart te plaatsen. Eén van deze loci werd eerder geplaatst als een broodtarwe cultivar-specifiek locus in IPO323 en blijkt nu ook verantwoordelijk te zijn voor de waardplantspecificiteit van dit isolaat voor de getoetste durumtarwe rassen. Onze gegevens laten zien dat waardplantspecificiteit mogelijk het resultaat is van de combinatie van een aantal onafhankelijk overerfbare avirulentiefactoren.

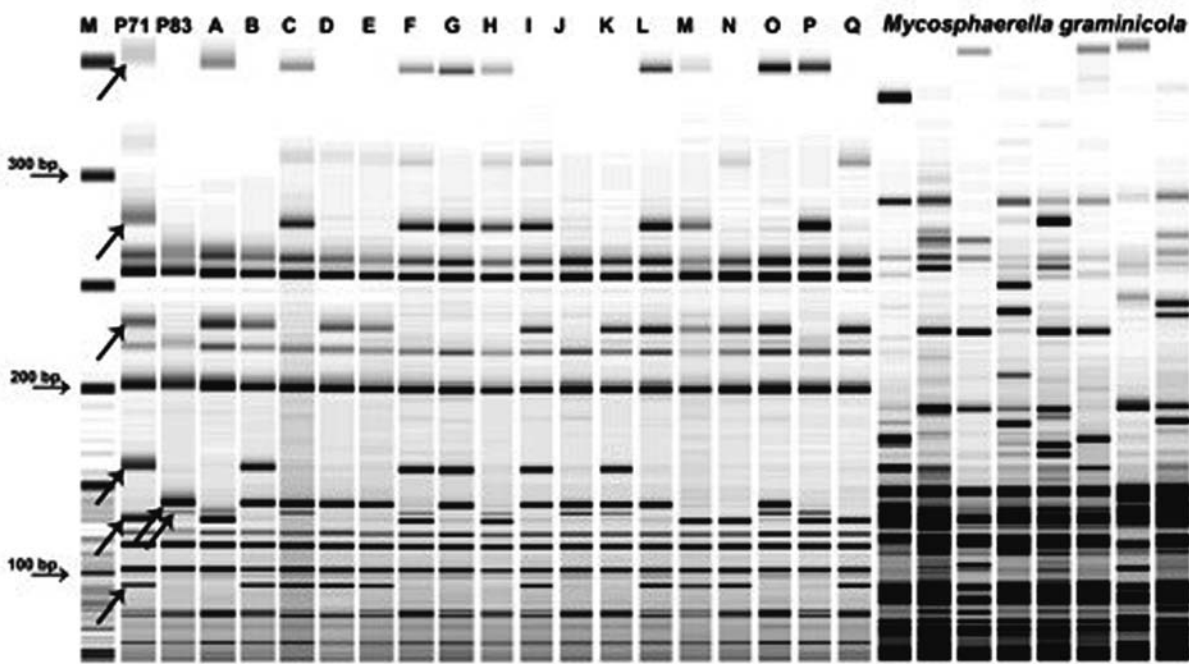
Fungicideresistentie

Naast avirulentiefactoren kunnen schimmels ook andere eigenschappen overdragen naar nakomelingen. Een dergelijke eigenschap is een door een puntmutatie in het mitochondrium veroorzaakte resistentie tegen strobilurine fungiciden. In een onderzoek naar de overerving van strobilurine resistentie werden resistente en gevoelige *M. graminicola*-isolaten gekruist op onbehandelde en met diverse concentraties azoxystrobine (Amistar™) be-

handelde tarwezaailingen. De nakomelingschappen werden geanalyseerd op de overerving van de hiervoor genoemde mutatie. Preventieve behandelingen met 3.125-200% Amistar™ resulteerde in volledig resistente nakomelingschappen ondanks het feit dat nucleair gecodeerde eigenschappen normaal uitsplitsen en daarmee regelmatig meiotisch gedrag bevestigden. Wij concluderen dat gevoelige isolaten de uitschakeling van de mitochondriale ademhaling omzeilen door deel te nemen aan de geslachtelijke reproductie; zelfs onder hoge selectiedruk die dit gedrag in *M. graminicola* induceert of waaruit dit gedrag resulteert.

Mycosphaerella-teleomorf van *S. passerinii*

Uit fylogenetisch onderzoek, waarin gebruik is gemaakt van ITS sequenties, blijkt dat het gerstepathogeen *S. passerinii* nauw verwant is aan *M. graminicola* en dat natuurlijke



Figuur 2. AFLP-patroon van de *Septoria passerinii* ouderisolaten P71 en P83 vergeleken met 17 ascospore-nakomelingen (isolaat A - Q) en zeven monoascospore-isolaten van *Mycosphaerella graminicola*. *EcoRI*-GA- en *MseI*-CC-primers zijn gebruikt voor alle isolaten. Diagonale pijlen geven polymorfe banden aan tussen de *S. passerinii* ouderisolaten (zes van P71 en twee van P83). Bij de horizontale pijlen wordt de grootte van de referentiemerkers aangegeven.

populaties een grote genetische diversiteit vertonen (Figuur 2). Echter, tot nu toe is er geen teleomorf voor deze schimmel gevonden en wordt zij daarom als ongeslachtelijk beschouwd. Desalniettemin zijn recent wel de paringsgenen geïdentificeerd en gekloneerd. Er is nagegaan of *S. passerinii* een *Mycosphaerella*-teleomorf zou kunnen hebben. Isolaten met een tegengesteld paringstype werden gezamenlijk geïnoculeerd op gerstrassen en de bladeren werden onderzocht op het uitschieten van ascosporen. De karakterisering

van een moeizaam verkregen uitsplitsende populatie met behulp van moleculaire en fenotypische kenmerken bevestigde uiteindelijk de productie van een tot nu toe onbekende *Mycosphaerella*-teleomorf van *S. passerinii*.

Conclusies

Het feit dat avirulente *M. graminicola*-isolaten een geslachtelijke cyclus kunnen aangaan op resistente rassen geeft een nieuwe invalshoek op de populatiegenetica van dit pathogeen

die tot nu toe ook niet in overweging is genomen in de epidemiologie. De resultaten van dit proefschrift benadrukken de belangrijke rol van de geslachtelijke voortplanting voor het succes van *M. graminicola* als pathogeen van tarwe.

PROMOTIES