

Source: Takabayashi & Dicke, 1992

Figuur 2: A closed system Y-tube olfactometer used for olfactory responses of the predatory mites *Typhlodromalus manihoti* and *T. aripo*. (source: Takabayashi & Dicke, 1992)

Omggaan met concurrenten

Wanneer carnivore arthropoden op zoek zijn naar geschikt voedsel en een geschikte leefomgeving voor zichzelf en voor hun nakomelingen, dan moeten ze tegelijkertijd voorkomen dat ze zelf voedsel voor andere organismen worden. Wij onderzochten hoe vluchtige informatiestoffen van prooihaarden waarin concurrenten aanwezig zijn het gedrag van de roofmijten beïnvloeden (hoofdstuk 6). Hiervoor werden de exotische roofmijtsoorten *T. manihoti* en *T. aripo* en de inheemse soort *Euseius fustis* gebruikt. *Mononychellus tanajoa* is een gangbare prooimijtsoort voor *T. manihoti* en *T. aripo* en, in veel mindere mate, ook voor *E. fustis*. De resultaten laten zien dat de drie roofmijtsoorten in staat zijn om de geschiktheid van de prooihaard te beoordelen met behulp van geurstoffen. *Typhlodromalus manihoti* vermeed *T. aripo* zowel op bladeren als apices. Als echter een keuze werd gegeven tussen geuren van een prooihaard met *T. aripo* en een prooihaard met *T. manihoti* dan had *T. manihoti* de voorkeur voor geuren van de prooihaard met *T. aripo*. *Typhlodromalus manihoti* maakte dus onderscheid tussen geuren van prooihaarden met concurrenten en heterospecifieke concurrenten en had voorkeur voor prooihaarden

met heterospecifieke roofmijten.

Typhlodromalus aripo had ook voorkeur om geuren van prooihaarden waarin conspecifieke roofmijten aanwezig zijn te vermijden.

Euseius fustis vermeed geuren van prooihaarden met conspecifieke concurrenten of één van de heterospecifieke soorten *T. manihoti* en *T. aripo*. Onder natuurlijke omstandigheden kunnen de drie roofmijtsoorten met elkaar in aanraking komen in situaties waarin voedsel schaars wordt. Deze resultaten laten zien dat naast predator-prooi interacties ook interacties tussen de verschillende predatoren in beschouwing moeten worden genomen als belangrijke bepalende factoren voor de populatiedynamica van predator- en prooi-soorten.

Conclusies

De belangrijkste conclusies zijn dat (i) geurstoffen van cassave beschaadigd door de belangrijkste prooi-soort *M. tanajoa* belangrijk zijn voor het van een afstand lokaliseren van de prooi door de roofmijten *T. manihoti* en *T. aripo*, (ii) geurstoffen geïnduceerd door verschillende prooi-soorten en combinaties van prooi-soorten de interacties met predatoren in het cassave agro-ecosysteem kunnen beïnvloeden, (iii) *T. aripo* en *T. manihoti* beter presteren wanneer ze zich voeden op *M. tanajoa* dan op *O. gossypii* of *T. urti-*

cae, (iv) *T. aripo* samen kan voorkomen met *T. manihoti* door de scheiding van niches, (v) de aanwezigheid van de inheemse roofmijt *E. fustis* in het cassave agro-ecosysteem hoogst waarschijnlijk niet met het voedselzoek-gedrag van de exotische roofmijtsoorten interfereert.

Resistance of plants to the fungal pathogen *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici*

B.F. Brandwagt

Op 8 november 2001 promoveerde aan de Vrije Universiteit Amsterdam Bas F. Brandwagt op een proefschrift getiteld: 'Resistance of plants to the fungal pathogen *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici* - discovery of a novel type of plant disease resistance gene'. Promotor was Prof. dr. H.J.J. Nijkamp, hoogleraar in de Genetica; co-promotor was Dr. J. Hille.

Inleiding

Planten worden voortdurend blootgesteld aan pathogene schimmels. Plantepathogene schimmels kunnen op basis van hun 'groeiwijze' in twee groepen verdeeld worden: biotrofe en necrotrofe schimmels. Biotrofe schimmels hebben een intieme relatie met planten omdat zij in levende plantenweefsels groeien. Er zijn al veel resistentie (R)-genen van planten opgespoord die effectief zijn tegen biotrofe pathogene schimmels. Deze genen maken eiwitten met een karakteristieke bouw en zorgen voor afweerreacties na herkenning van biotrofe schimmels volgens het 'gen-om-gen' principe. Necrotrofe schimmels daarentegen hebben een minder elegante levensstijl. Ze onderdrukken of elimineren het wapenarsenaal van planten met behulp van hun uitgescheiden toxische stoffen (mycotoxines) om groei op dode plantenweefsels mogelijk te maken.

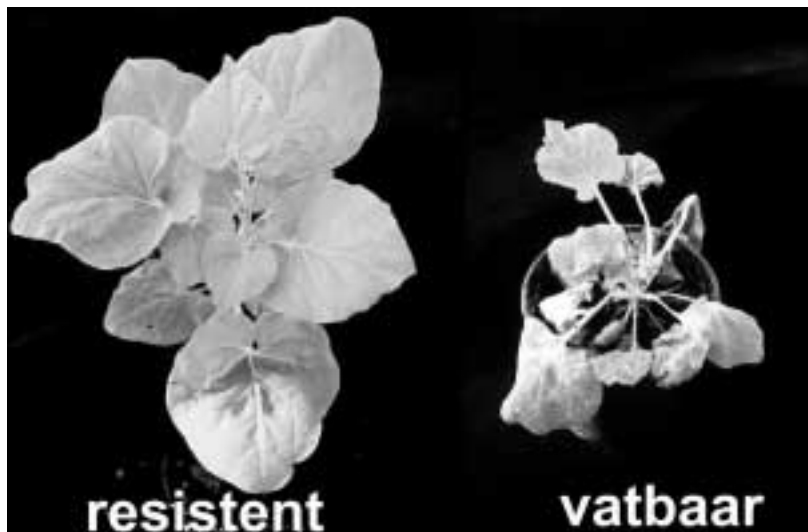
R-genen tegen necrotrofe schimmels zijn minder talrijk en hebben in het verleden minder aandacht gekregen. Tot nu toe is gevonden dat deze R-genen kunnen zorgen voor toxine-ongevoeligheid door middel van 1) detoxificatie, 2) afwezigheid of 3) veranderde eigenschappen van de doelwitten van de toxines.

Interactie tomaat - *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici*

In tomaat (*Lycopersicon esculentum*) bepaalt het *Alternaria* stengelkanker locus (*Asc*) resistentie tegen het necrotrofe schimmel-pathogeen *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici*. Stengelkanker-resistente tomatenplanten zijn ongevoelig voor de AAL toxines die door *A. alternata* f.sp. *lycopersici* worden uitgescheiden. Echter, het onderliggende mechanisme is onbekend. AAL toxines en fumonisines van de niet-gerelateerde schimmel *Fusarium moniliforme* zijn beide sfinganineachtige mycotoxines (SAMs). Sfinganine is een voorloper molecuul van sfingolipiden, een bepaalde klasse van noodzakelijke vetten in een cel. Lage SAM concentraties verstoren de sfingolipidenbalans van cellen door remming van het enzym sfinganine *N*-acyltransferase, gevolgd door geprogrammeerde celdood in bepaalde plantensoorten en zoogdierencellijnen. SAMs komen vaak voor als besmettingen in voedsel en zijn mogelijk kanker- verwekkend, hetgeen de zoektocht naar de principes van SAM-ongevoeligheid duidelijk maakt.

Resistentie mechanisme

Het belangrijkste onderwerp van dit proefschrift was het ontrafelen van het resistentie-mechanisme in tomaat tegen *A. alternata* f.sp. *lycopersici* en SAMs door de moleculaire karakterisatie van het *Asc* locus. Zou de werkingwijze van SAMs tot een snelle indentificatie van het *Asc* gen geleid kunnen hebben? Enzymen die fumonisines kunnen afbreken, waren al bekend in zwarte gis-



Figuur 1. Twee verschillende *Nicotiana umbratica* genotypes die bespoten zijn met een sporenoplossing van *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici*. De foto is een week na inoculatie gemaakt. Resistentie en vatbaarheid voor *A. alternata* f.sp. *lycopersici* in deze tabaksoort zijn genetisch vergelijkbaar met tomaat.

ten. Verder waren er een aantal gistgenen bekend die ongevoeligheid voor het verstoren van sfingolipiden biosynthese veroorzaken. Daarentegen was het nog steeds mogelijk dat het *ASC* eiwit SAMs kon activeren. Als gevolg van de diverse hypothetische functies van het *Asc* locus, is gekozen voor een moleculair-genetische benadering. Echte mutanten waarin het *Asc* locus is uitgeschakeld door een nabijgelegen, springend DNA-element of door chemische mutagenese werden niet gevonden. We hebben daarom het gen gezocht en gevonden door chromosoomwandelen vanaf moleculaire wegwijzers naast het *Asc* locus. Ongevoeligheid van tomaat voor SAMs bleek bepaald te worden door het *Asc-1* gen, dat homoloog is met een levensduurgen van gist (*LAG1*). Gevoeligheid van tomaat voor SAMs gaat samen met een verandering in het *Asc-1* gen die leidt tot functieverlies. Geen van R-genen van bekende planten of één van de genen uit de door ons opgestelde hypothese waren homoloog aan *Asc-1*. SAM-ongevoeligheid in tomaat wordt dus door een onverwacht mechanisme veroorzaakt. Het *Asc-1* gen is geconserveerd en wijdverbreid in hoge en lage eukaryoten, wat een basale functie van het *ASC-1* eiwit in de cel doet vermoeden. Sfingolipiden en *LAG1*-eiwitten versoepelen het interne

transport van bepaalde noodzakelijke eiwitten in gist. Daarom stellen wij voor dat het *Asc-1* gen een rol speelt in een reddingsoperatie van plantencellen waarin sfingolipiden uitgeput zijn. De recente ontdekking dat de gist *LAG-1* eiwitten nodig zijn voor sfinganine *N*-acyltransferase enzymactiviteit, is een indicatie dat het *ASC-1* eiwit inderdaad een rol kan spelen in de sfingolipiden biosynthese in planten. Drie *Asc-1* genhomologen komen voor in het genoom van het modelplantje *Arabidopsis thaliana* (zandkrak), hetgeen de studie naar de functie van *ASC* eiwitten vergemakkelijkt.

Het mechanisme waarmee het *Asc-1* gen de SAM-ongevoeligheid en resistentie tegen *A. alternata* f.sp. *lycopersici* bepaalt, werd verder onderzocht. Door 68 tabaksoorten (*Nicotiana*) te testen, werden SAM-gevoelige planten gevonden in 5 soorten. In deze soorten wordt SAM-gevoeligheid en ongevoeligheid bepaald door een *Asc*-achtig locus, waardoor het logisch lijkt dat deze planten ook gevoelig zijn voor de schimmel. SAM-gevoelige *Nicotiana umbratica* planten zijn inderdaad gevoelig voor *A. alternata* f.sp. *lycopersici*. Verhoogde expressie van het *Asc-1* gen in transgene harige tomatenwortels of in transgene *N. umbratica* planten zorgde voor toe-

PROMOTIES

genomen SAM-ongevoeligheid en resistentie tegen *A. alternata* f.sp. *lycopersici* infectie. Om te bestuderen of gevoeligheid voor SAMs kan voorspellen of een plant gevoelig is voor *A. alternata* f.sp. *lycopersici*, zijn de resterende vier *Nicotiana* soorten getest. SAM-gevoelige planten van deze soorten waren echter resistent tegen *A. alternata* f.sp. *lycopersici*, dat samenging met locale celdood, wellicht door extra resistentiemechanismen.

Conclusie en vooruitblik

Het *Asc-1* gen van tomaat geeft resistentie tegen het pathogeen *A. alternata* f.sp. *lycopersici* en verzorgt een dosis-afhankelijke ongevoeligheid voor SAMs. De rol van AAL toxines in het bepalen van de waardplantenreeks van *A. alternata* f.sp. *lycopersici* is beperkt. De resultaten in dit proefschrift vormen een goede uitgangspositie om de rol van svingolipiden in planten te bepalen.

In gist en zoogdieren wordt het steeds duidelijker dat svingolipiden de celgroei en reacties als gevolg van stress besturen. Een belangrijke uitdaging is dus het bepalen van de rol van het *Asc-1* gen in vergelijkbare processen in planten.

PROMOTIES