

Dr. V.G.A.A. Vleeshouwers

Op 5 januari 2001 promoveerde aan de Wageningen Universiteit Vivianne G.A.A. Vleeshouwers op een proefschrift getiteld: '**Molecular and cellular biology of resistance to *Phytophthora infestans* in *Solanum* species**'. Het onderzoek was uitgevoerd bij Plant Research International, in nauwe samenwerking met het Laboratorium voor Fytopathologie, Wageningen Universiteit. De promotor was prof. dr. ir. P.J.G.M. de Wit, hoogleraar Fytopathologie, en de co-promotoren waren dr. ir. F. Govers, universitair hoofddocent aan het Laboratorium voor Fytopathologie, en dr. ir. L.T. Colon, onderzoeker bij Plant Research International. Het onderzoek was gefinancierd door de Stichting Stimulering Aardappelonderzoek (Zeist, Nederland).

Korte inhoud van het proefschrift

De aardappelziekte

Het is inmiddels al meer dan 150 jaar geleden dat in Europa de aardappelziekte uitbrak, en nog steeds kost het grote inspanningen om ons gewas te beschermen. Elk jaar worden enorme hoeveelheden dure chemische middelen toegediend, die een bedreiging kunnen vormen voor het milieu. Het gebruik van re-

sistente aardappelrassen zou een elegante oplossing voor het probleem zijn. Naast het benodigde hoge niveau van resistentie is het ook belangrijk dat deze duurzaam is. Er zijn echter nog te weinig rassen beschikbaar die aan beide eisen voldoen. De veroorzaker van de aardappelziekte is *Phytophthora infestans*. Hoewel *P. infestans* morfologisch lijkt op een schimmel, is het een heel ander type organisme: een oömyceet. Oömyceten zijn onafhankelijk van schimmels geëvolueerd, hetgeen impliceert dat ze op een eigen manier de interactie met de plant aangaan. Naar verwachting zal een beter inzicht in resistentiemechanismen van de plant tegen *P. infestans* de veredelaars kunnen helpen om een duurzame vorm van resistentie te ontwikkelen.

Resistentie

Genetische resistentie kan worden bepaald op ras- of variëteitniveau (fysio-specifieke resistentie, is alleen werkzaam in bepaalde variëteiten en tegen bepaalde isolaten), of op soort- of geslachteniveau (niet-waard resistentie). De niet-waard resistentie is volledig en komt voor in de meeste plantensoorten. Daarnaast kan resistentie kwantitatief zijn (partiële resistentie). In wilde verwanten van de aardappel (*Solanum tuberosum*) komen diverse vormen en niveaus van resistentie voor, variërend van volledig resis-

tent tot verschillende niveaus van partiële resistentie. Ook in een aantal oude aardappelrassen is partiële resistentie aanwezig, die bovendien duurzaam blijkt te zijn. Om duurzame resistentie tegen *P. infestans* in moderne aardappelrassen te bereiken, is een dieper inzicht in de moleculaire basis van deze verschillende resistenties essentieel. Hiertoe hebben we een set van *Solanum* soorten met verschillende vormen en niveaus van resistentie samengesteld en de cellulaire en moleculaire aspecten van onderliggende resistentiemechanismen bestudeerd.

Laboratoriumtest

Voor cellulair en moleculair resistentie onderzoek is een betrouwbaar experimenteel toetsysteem nodig, dat een hoge en reproduceerbare infectie garandeert en dat bovendien vergelijkbaar is met de veldsituatie. Hiertoe hebben we onder gecontroleerde omstandigheden in het laboratorium een resistentietoets met afgesneden bladeren ontwikkeld. Deze laboratoriumtoets hebben we vervolgens vergeleken met een veldproef. De geteste condities waaronder de planten waren opgekweekt hadden geen invloed op hun resistentie tegen *P. infestans*. De bladeren aan intacte planten waren meer resistent dan afgesneden bladeren en het verschil in resistentie kon verklaard worden door de incubatiecondities die gunstiger zijn in de laboratoriumtoets. Op intacte planten was de infectiefrequentie echter erg laag, hetgeen ongewenst is in moleculair onderzoek. Omdat een set van twintig planten onder verschillende omstandigheden een vergelijkbare rangorde in resistentieniveau liet zien, konden we concluderen dat de laboratoriumtoets geschikt was om de interactie tussen *Solanum* en *P. infestans* te bestuderen.

De overgevoelighedsreactie

Een cytologische overzichtstudie van de interactie tussen twintig *Solanum* genotypen en drie *P. infes-*

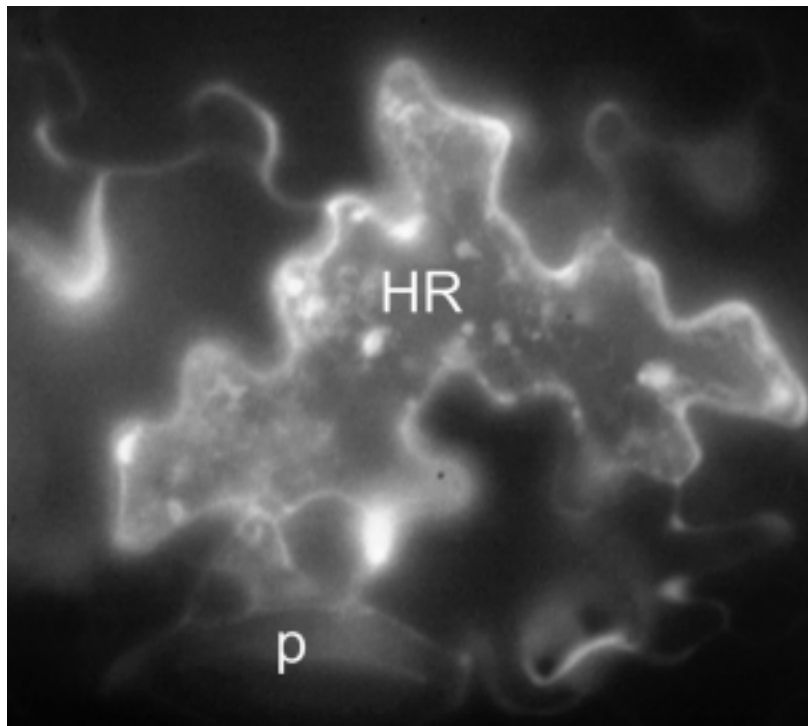


Symptomen van *Phytophthora infestans* op een vatbare *Solanum microdontum*.

tans isolaten gaf een eerste indruk van de aard van de resistentiereacties. Aardappelrassen met fyso-specifieke resistentiegenen (*R* genen) lieten de overgevoeligheidsreactie zien ('Hypersensitieve Response', HR). De HR is een vorm van geprogrammeerde celdood, waarbij het patho-geen in korte tijd geïsoleerd wordt te midden van dode plantencellen en daardoor niet verder kan uit-groeien. Ook in de duurzaam resis-tente aardappelrassen zonder be-kende *R* genen waaronder wilde *Solanum* soorten en niet-waard-planten was de HR zichtbaar. In res-istente *Solanum* soorten zoals *S. berthaultii* en *S. circaeifolium* en in niet-waardplanten zoals *Arabidop-sis thaliana* (zandraket) en *S. nig-rum* (zwarte nachtschade), was de HR extreem snel en effectief; de re-actie bleef beperkt tot een klein aantal cellen. In partieel resistente planten kwam de HR later op gang, wat resulteerde in grotere HR lesies voordat doorgroei van het patho-geen gestopt werd. Soms bleken hy-fen in staat om uit deze HR lesies te ontsnappen en een biotrofe inter-actie met hun waardplant aan te gaan. De effectiviteit waarmee de HR *P. infestans* kon indammen ver-schilde aanmerkelijk tussen de ver-schillende *Solanum* genotypen en was gecorreleerd met de resistentie-niveaus. Naast de HR werden ook nog andere reacties waargenomen, zoals locale afzettingen van callose en fenolische verbindingen, die zouden kunnen fungeren als fysi-sche barrières. Deze reacties waren niet gecorreleerd met de resisten-tieniveaus. Uiteindelijk lijkt een ba-lans tussen uitgroei van het patho-geen en inductie van de resistentiereacties te bepalen of een infectie slaagt op celniveau; de va-riatie tussen de effectiviteit van re-acties op meerdere infectieplaatsen illustreert het kwantitatieve karak-ter van de *P. infestans* resistentie op plant- of veldniveau.

Resistentiegenen

De HR wordt in gang gezet wanneer specifieke receptoren van de plan-tencel elicitors van pathogenen



Microscopische opname van een overgevoeligheidsreactie. Phytophthora infestans penetreert een epidermiscel van aardappel. Deze cel reageert overgevoelig, te zien als gele autofluorescentie, en de cel sterft af. Phytophthora kan nu niet verder groeien, en het blad wordt dus niet verder geïnfecteerd. (p = penetratie, HR = overgevoeligheidsreactie)

herkennen. Volgens de 'gen-om-gen' hypothese coderen specifieke resistentiegenen voor deze receptoren. Er is een aantal typen *R* genen bekend, waarbij het 'nucleotide binding site leucine-rich repeat' (NBS-LRR) type het meest bestudeerd is. Een ander type omvat de *Pto*-achtige serine/threonine kinasen, die oorspronkelijk zijn gevonden in wilde verwanten van tomaat. We hebben in het geslacht *Solanum* een aantal *Pto*-achtige sequenties geïdentificeerd en met behulp hiervan de evolutie van *Pto*-achtige genen bestudeerd. Fylogenetische analyses onderscheidden negen klassen van *Pto*-achtige genen en hier leken de orthologen (homologen ontstaan door soortvorming) meer op elkaar dan de paralogen (homologen ontstaan door genduplicatie). Dit wekt de suggestie dat de *Pto* familie geëvolueerd is door middel van een serie genduplicaties die nog voor de soortvorming in *Solanum* zijn opgetreden. In lijn met recente bevindingen voor NBS-LRR *R* genen, blijken de *Pto*-achtige genen een grote diversiteit te bezitten en van oude oorsprong te zijn.

PR eiwitten

Verschillende niveaus van niet-specifieke resistentie in *Solanum* kwamen naar voren in resistentieproeven met vijf verschillende *P. infestans* isolaten. In partieel resistente planten waar hyfen uit HR lesies ontsnappen, breidden de lesies zich vaak langzamer uit dan in vatbare planten. Blijkbaar is hier een systemisch resistentiemechanisme actief; dit zou bijvoorbeeld op 'systemic acquired resistance' (SAR) kunnen berusten. SAR kan worden geïnduceerd door verschillende signalen, maar ook basale niveaus van SAR kunnen variëren tussen planten. Om te testen of basale niveaus van SAR correleren met niet-specifieke resistentie hebben we in gezonde bladeren de basale expressie niveaus bepaald van een aantal SAR merker genen, de zogenaamde pathogenese-gerelateerde (*PR*) genen *PR-1*, *PR-2* en *PR-5*. Op geslachtsniveau was er geen correlatie tussen basale mRNA niveaus van *PR* genen en niet-specifieke resistentie tegen *P. infestans*. Binnen de soorten *S. arnezii* x *hondelmannii*, *S. microdon-tum*, *S. sucrense* en *S. tuberosum*

PROMOTIES

was er echter een positieve correlatie tussen niveaus van *PR* mRNA en niet-specifieke resistentie. Voor de aardappelrassen waren de *PR* expressieniveaus het hoogst in de resistente 'Robijn', middelmatig in de partieel resistente 'Ehud', 'Estima' en 'Première', en het laagst in de vatbare 'Bintje'. Dit suggereert dat constitutieve expressie van *PR* genen zou kunnen bijdragen aan niet-specifieke resistentie tegen *P. infestans*. *PR* mRNA niveaus zouden dus als moleculaire merkers gebruikt kunnen worden in de aardappelveredeling.

Toekomst perspectief

In *Solanum* soorten opereren diverse specifieke en niet-specifieke resistentiemechanismen tegen *P. infestans* op verschillende niveaus. De sterke associatie van de HR met alle vormen van resistentie geeft aan dat een groot aantal *R* genen tegen oömyceten aanwezig is in *Solanum*. Het is nu van belang om de *R* genen tegen *P. infestans* te identificeren en over te brengen naar commerciële aardappelrassen.

Stellingen:

De associatie van de overgevoelheidsreactie met alle vormen van resistentie tegen *Phytophthora infestans* impliceert dat resistentiegenen een belangrijke rol zullen spelen in het verkrijgen van duurzame resistentie.

dit proefschrift

Het promoten van 'R-gene free potatoes' door het 'International Potato Center' als uitgangsmateriaal voor resistentieveredeling getuigt van te weinig inzicht in de biologie van de aardappel - *P. infestans* interactie.

CIP Program Report, 1995-1996 dit proefschrift

The road to plant disease resistance will always be under reconstruction.

Nu onderkend wordt dat *Phytophthora* niet tot het schimmelrijk behoort, evolueert de 'nachtmerrie van de schimmelgeneticus' tot een

'droom voor de bioloog'; *Phytophthora* is nu immers het best bestudeerde genus binnen zijn Rijk. David Francis, *Phytophthora* Beyond Y2K Symposium, Wooster, 1999

Phytophthora-resistentie is milieudefensie.

Dirk Budding

Definities zijn vooral nuttig in het beginstadium van biologisch onderzoek, maar in een meer gedetailleerde fase mogen ze een vrije manier van denken niet belemmeren.

Het feit dat de meeste mensen denken dat de champignon in de salade nauwer verwant is aan sla dan aan de kok, geeft aan dat mensen hun kennis over evolutie overschatten.

Een grote overeenkomst tussen de wetenschapper en de kunstenaar is verbeeldingskracht.

Dr. E.T.M. Meekes

Op 27 juni 2001 promoveerde aan de Wageningen Universiteit Ellis T.M. Meekes op een proefschrift getiteld: '**Entomopathogenic fungi against whiteflies: tritrophic interactions between *Aschersonia species*, *Trialeurodes vaporariorum* and *Bemisia argentifolii*, and glasshouse crops**'. Het onderzoek was uitgevoerd bij Entomologie, Wageningen Universiteit, in nauwe samenwerking met het Proefstation voor Bloemisterij en Glasgroentes te Aalsmeer. De promotor was prof. dr. J.C. van Lenteren, hoogleraar Entomologie, en de co-promotor was dr. ir. J.J. Fransen, senior onderzoeker Entomologie, Proefstation voor Bloemisterij en Glasgroentes te Aalsmeer. Het onderzoek was gefinancierd door het Productschap Tuinbouw.

Insectpathogene schimmels tegen witte vlieg

De plaag: witte vlieg

Vele gewassen vormen een goede waardplant voor de kaswittevlæg

Trialeurodes vaporariorum en de tabakswittevlæg *Bemisia argentifolii*. Witte vlæg kan op verschillende manieren schade veroorzaken. Wanneer ze in grote getale aanwezig zijn kan dit leiden tot bladval en verminderde vruchtgroei. Ze kunnen verschillende plantenvirussen overbrengen, waardoor een enkele witte vlæg besmet met een plantenvirus al grote problemen kan veroorzaken. Daarnaast produceren ze honingdauw, waarop roetdauw-schimmels goed kunnen groeien en wat vruchten en bloemen onverkooptbaar maakt.

Het huidige beleid is erop gericht om de afhankelijkheid en het gebruik van chemische bestrijdingsmiddelen terug te dringen. Een belangrijk alternatief is biologische bestrijding waarbij predatoren, parasitoiden en pathogenen worden ingezet om een plaag onder controle te krijgen. Hoewel de sluipwespe, *Encarsia formosa*, zeer succesvol is in bestrijding van witte vlæg in kassen, bleek ze niet in elk gewas even effectief te zijn. Bovendien preferert ze *T. vaporariorum* boven *B. argentifolii*, waardoor de laatste alsnog een plaag kan vormen.

De bestrijders: insectpathogene schimmels

Insectpathogene schimmels werken relatief snel ten opzichte van predatoren en parasitoiden en zijn met conventionele spuitapparatuur toe te dienen. De sporen worden op het gewas gespoten, vaak in hoge dosis en de behandeling wordt enkele keren herhaald. Insectpathogene schimmels worden dan ook vaak aangeduid als myco-pesticiden. De werking is als volgt: de spore beplant op het insect, kiemt, penetreert de cuticula en voedt zich met het insect. Het insect zal hieraan sterven en de schimmel groeit vervolgens weer naar buiten en sporuleert.

Insectpathogene schimmels kunnen onderverdeeld worden in twee groepen, specifieke schimmels die alleen witte vlæg infecteren, zoals *Aschersonia* soorten en breed werkende schimmels, die insecten uit verschillende ordes kunnen infecte-

ren en soms ook andere schimmels. Voorbeelden hiervan zijn *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* en *Verticillium lecanii*. Het voordeel van het gebruik van specifieke schimmels is dat ze andere natuurlijke vijanden niet zullen infecteren.

Aschersonia soorten werden al aan het begin van de vorige eeuw ingezet voor biologische bestrijding van citruswittevlug in Florida. De schimmel komt daar van nature voor en werd kunstmatig gekweekt zodat citrustelers de schimmel in overmaat in hun boomgaarden konden inzetten. Van 1960 tot 1980 werden verschillende soorten ingezet ter bestrijding van citruswittevlug en kaswittevlug in verschillende Oost Europese landen. Doordat deze schimmels naast andere natuurlijke vijanden te gebruiken zijn en er aanwijzingen zijn dat ze minder gevoelig zijn voor lagere luchtvochtigheden, is er nog steeds belangstelling voor deze groep.

Selectie van een effectieve schimmel

Verschiedende criteria kunnen worden gebruikt voor het selecteren van een succesvolle schimmel: gastheerspecificiteit, virulentie, persistentie en het gemak waarmee ze kunnen worden geproduceerd. Verder kunnen omgevingsfactoren de effectiviteit van een schimmel beïnvloeden. Over het algemeen hebben schimmelsporen een zeer hoge relatieve luchtvochtigheid nodig (meer dan 92%) om te kunnen kiemen hetgeen zeer lang een struikelblok is geweest voor het gebruik van insectpathogene schimmels voor biologische bestrijding. Daarnaast kan het insect zelf of de plant waarop het insect voorkomt een grote rol spelen.

Vierenveertig *Aschersonia* isolaten zijn getoetst op hun vermogen om goed te sporuleren op kunstmatig medium en op hun virulentie tegen kas- én tabakswittevlug. Beide criteria zijn belangrijk voor het succesvol gebruik van schimmels ter bestrijding van witte vlug. Virulen-

tie van de isolaten tegen kaswittevlug was positief gecorreleerd met virulentie tegen tabakswittevlug. Uiteindelijk bleek dat vier isolaten, te weten *A. aleyrodis*, *A. placenta* en twee niet geïdentificeerde *Aschersonia* isolaten, een hoge sporenproductie op gierst medium combinerden met een hoge virulentie tegen beide wittevlugsoorten.

Persistentie van *Aschersonia* sporen

Bij bespuitingen zullen maar weinig sporen direct in contact komen met het insect. De sporen kunnen echter later door het insect worden opgepikt en het infecteren, mits ze dan nog levensvatbaar zijn. De kiemkracht van sporen van *A. aleyrodis* bleef erg lang behouden. Na een maand op een komkommerblad bleek 90% van de sporen nog levensvatbaar, op kerststerblad bleek dit gemiddeld 70% en op gerberabladd 'slechts' gemiddeld 50% te zijn. Voor komkommer en gerbera bleek dit een goede maat voor de infectiekans van kaswittevluglarven: op komkommer werd na een maand nog steeds 90% van de larven gedood door infectie, op gerbera varieerde dat tussen 50 en 70%. Op kerstster bleef het dodingpercentage echter ver achter bij de verwachting, het daalde van 70% op de dag van bespuiting naar 20% op dag 3 na bespuiting. Op bladeren van de drie gewassen bleek er nauwelijks kieming te zijn opgetreden, wat kan wijzen op een "zit-en-wacht" strategie van *A. aleyrodis* in plaats van te kiemen en naar de gastheer te groeien. Ondanks de grote invloed van de plantensoort op de persistentie van *A. aleyrodis* is de lange periode dat deze schimmel in staat is kaswittevlug te infecteren zeer opmerkelijk.

Invloed waardplant en luchtvochtigheid

Het infectieproces vindt plaats in een dunne laag op het blad en de luchtvochtigheid in deze laag is van groot belang voor de effectiviteit van insectpathogene schimmels.

De luchtvochtigheid in de fyllosfeer wordt mede bepaald door eigenschappen van de plant, zoals bladvorm en -grootte, bladbehang en dichtheid van het gewas. *A. aleyrodis* en *A. placenta* veroorzaakten op gerbera, komkommer en tomaat een veel hogere wittevlugsterfte dan *Verticillium lecanii*: 90-95% versus 50%, respectievelijk. Op kerstster lag de sterfte van de wittevluglarven veroorzaakt door de drie schimmels veel lager, namelijk op 20%. De luchtvochtigheid in de fyllosfeer van komkommer was hoger in vergelijking met de luchtvochtigheid op andere gewassen en kan dus de gevonden verschillen niet verklaren. Het verschil tussen *Aschersonia* en *Verticillium* kan veroorzaakt zijn door een verschil in virulentie of doordat deze schimmels verschillende luchtvochtigheidseisen hebben voor kieming.

Wanneer de omgevingsluchtvochtigheid werd verhoogd leidde dit tot een hogere infectie van witte vlug op komkommer en gerbera, echter niet op kerstster. Verder bleek dat *A. aleyrodis* en *A. placenta* effectiever waren bij lage luchtvochtigheden dan *V. lecanii*. Op kerstster hadden de schimmels alleen effect als de luchtvochtigheid minimaal twee dagen tussen 95 en 100% was, terwijl op komkommer onder relatief droge omstandigheden (45% RV) *A. aleyrodis* al 50% sterfte veroorzaakte. Hieruit blijkt dat wanneer de omgevingsluchtvochtigheid maar gunstig genoeg is, de grote verschillen in effectiviteit van de schimmels op de verschillende plantensoorten verminderen. Door schimmels te formuleren tot een product, waardoor ze minder afhankelijk worden van hun omgeving, kan dit probleem mogelijk omzeild worden. Echter de invloed van de omgevingsluchtvochtigheid op de effectiviteit van de schimmel wordt sterk beïnvloedt door de plant waarop het infectieproces zich afspeelt. Dit kan eventuele verschillen in effectiviteit van schimmels op één plantensoort verklaren, maar de invloed van de planten overtreft het effect van omgevingsluchtvochtigheid.

Dat de plantensoort de kiemkracht

PROMOTIES