

# Geïnduceerde resistentie tegen *Botrytis* in tulp en lelie.

*Eindverslag ten behoeve van project PT10769.*

*Plant Research International B.V.  
Droevendaalsesteeg 1  
6708 BP Wageningen.*

Gegevens:

Financier: Productschap Tuinbouw

PT projectnummer: 10769

PRI projectnummer: 6600037/07600003700

Projectleider: Frans Krens (PRI)

Onderzoekperiode: 2001-2003

Begeleidingscommissie:

Dick van Kleinwee (bedrijfsleven)

Marian de Boer (opvolgster van Ernst van den Ende) (PPO)

Corine Anker (opvolgster van Jaap de Vries) (PT) Voorzitter

Kees van Loon (RUU)

Projectmedewerkers:

Frans Krens

Jaap van Tuyl

Sjaak van Heusden

Theo Prins (opvolger van Jurriaan Mes)

Paul van Empel

Ria Jongerius

## Inhoudsopgave

Inhoudsopgave.....	3
Voorwoord.....	4
Samenvatting.....	4
Doelstelling.....	5
Onderzoeksomschrijving.....	5
Materiaal en Methoden.....	7
Resultaten.....	13
Discussie.....	22
Conclusies.....	24
Literatuur.....	25

## Voorwoord

Het lopende onderzoek naar *Botrytis* bij tulp en lelie valt onder "Duurzame bollenteelt" van het LNV-DWK programma 364 (Innovatie in siergewasketens door gerichte veredeling en verbeterd uitgangsmateriaal). Als aanvulling op dit voornamelijk veredelings- en selectiegericht onderzoek is een aanvraag gedaan bij het Productschap Tuinbouw voor een onderzoek naar geïnduceerde resistentie. Het doel was de sector van dienst te kunnen zijn door kennis te vergaren voor een betere *Botrytis* bestrijding gepaard met een verminderd pesticidengebruik.

Binnen het project zijn vier onderdelen te onderscheiden:

Geïnduceerde resistentie van tulp

Geïnduceerde resistentie van lelie

Veredelingsonderzoek tulp

Veredelingsonderzoek lelie

Binnen deze vier onderzoeksgebieden ligt het zwaartepunt op geïnduceerde resistentie bij tulp omdat de praktijk van mening is dat de lage resistentie in geniteurs weinig mogelijkheden biedt voor veredeling van nieuwe cultivars met *Botrytis* resistentie.

Geïnduceerde resistentie betreft voornamelijk bladresistentie (vuur).

Daarnaast zal ook het veredelingsonderzoek zich concentreren op bladresistentie en ligt het zwaartepunt hiervan bij lelie.

## Samenvatting

De bollenteelt in Nederland is een belangrijke sector voor de export van bloemen en bloembollen. Helaas gaat de teelt noodzakelijkerwijs gepaard met een hoog gebruik aan bestrijdingsmiddelen en zowel de sector als de overheid zien het als hun taak voor de toekomst te streven naar een beperking. Om alternatieven voor de toekomst te ontwikkelen, heeft PT onderzoek uitgezet naar de toepassing van "geïnduceerde resistentie".

Geïnduceerde resistentie is het fenomeen dat een chemische behandeling van buitenaf bij planten een resistentie tegen pathogenen opwekt. Het chemische middel op zichzelf is daarbij niet schadelijk voor plant of milieu! Het is de opgeroepen afweer binnenin de plant zelf die pathogenen buitensluit.

Voor dit onderzoek is gebruik gemaakt van tulp en lelie in combinatie met de ziekteverwekker vuur (*Botrytis cinerea*). In het onderzoek zijn een groot aantal chemische stoffen getest waarvan in de literatuur is gevonden dat ze een remmende werking op ziekteontwikkeling hebben. Hier wordt dus getest of die stoffen ook hier bij lelie en tulp tegen vuur dit effect hebben.

Wat werd gevonden was, dat geen van de geteste stoffen een zichtbaar effect heeft op de terugdringing of voorkoming van vuur in tulp en lelie. Op basis van deze uitkomsten willen de auteurs dan ook geen voorstel naar de telers doen om over te gaan tot deze alternatieve bestrijdingsmethode.

Naast bestrijding van vuur kan er bij kruisingen ook geselecteerd worden voor ouders met vuurresistentie. Om het assortiment van resistente ouders te bepalen en om in een vroeg stadium na kruising al een uitspraak te kunnen doen over de resistentie van de nakomelingen, kunnen moleculaire merkertechnieken uitkomst bieden.

De eigenschap voor vuurresistentie ligt vast in het erfelijke materiaal van de plant. De plaats hiervan is op te sporen door middel van o.a. AFLP<sup>®</sup> merkers. Kortgezegd kunnen we dus

door de aan- of afwezigheid te bepalen van een dergelijke merker een uitspraak doen over de vuurresistentie.

Uit onderzoek dat we bij lelie (een kruising tussen Aziatische cultivars 'Connecticut King' en 'Orlito') hebben uitgevoerd, is allereerst een genetische kaart ('linkage map') van cultivar Connecticut King gemaakt. In de populatie 'Connecticut King' x 'Orlito' was uitsplitsing te zien voor vuurresistentie. De resistentietoetsen bleken over meer jaren heen niet altijd consistent. Toch hebben we een aantal mogelijke kandidaten voor merkers voor vuurresistentie kunnen oppikken. De betrouwbaarheid ervan moet nog beter vastgesteld worden door meer toetsen.

## Doelstelling

De mogelijkheid tot het toepassen van het fenomeen geïnduceerde resistentie in bolgewassen tegen *Botrytis* werd onderzocht. In het huidige project zijn technieken bestudeerd en is kennis opgebouwd over het toepassen van geïnduceerde resistentie. Ook is materiaal gegenereerd waarmee de veredelaar *Botrytis*-resistente bolgewassen kan produceren. Vanuit deze werkzaamheden kunnen bollentelers, -exporteurs en andere geïnteresseerden zich op de hoogte houden van het gebruik van resistente cultivars en mogelijke inductiemethoden.

## Onderzoeksomschrijving

### *Geïnduceerde resistentie (70% van de inzet)*

In menig gewas is al onderzoek geweest naar de induceerbaarheid van resistentie bij planten. Diverse methoden zoals chemische verbindingen, plantenextracten, micro-organismen of verbindingen geproduceerd door een pathogeen, zijn succesvol gebleken in de inductie van de afweerrespons en daarmee een onderdrukking van ziektesymptomen (Reglinski *et al.*, 1995; De Meyer *et al.*, 1998; Meir *et al.*, 1998; Seddon *et al.*, 1999; Siegrist en Muhlenbeck, 1999). Binnen dit project is het doel om bij tulp en lelie te zoeken naar een methode die de afweer activeert. Bij lelie is bijvoorbeeld gevonden dat salicylzuur (SA) resistentie tegen *Botrytis elliptica* induceert (Chen en Huang, 1997). Benzothiadiazole (BTH, geformuleerd als BION<sup>®</sup> van Novartis) is een verbinding die ook bij veel gewassen de systemische afweer induceert en waarschijnlijk in dezelfde route aangrijpt als SA (Lawton *et al.*, 1996). Probenazole, een ander type verbinding, blijkt ook de resistentie van lelie tegen *Botrytis* te activeren (Lu en Chen, 1998). Naast bovengenoemde verbindingen zou inductie van de afweer ook geactiveerd kunnen worden met een lage dosis van pathogene *Botrytis* of niet waardplant *Botrytis* soorten. Ook zijn er verbindingen gevonden die door een pathogeen wordt geproduceerd en als elicitors van de afweer van de plant kunnen werken. Bij lelie is gevonden dat een lage dosis van *Botrytis elliptica* op de onderste bladeren van een plant de afweer in de bovenste bladeren stimuleert (Chen en Chung, 1999). Als deze resultaten herhaalbaar blijken te zijn kan geconcludeerd worden dat inductie van de afweer bij lelie tot de mogelijkheden behoort en zal deze aanpak ook voor tulp getest worden. Dergelijke bevindingen geven aanwijzingen welke route in de plant belangrijk is voor de afweer en vormen een goed uitgangspunt om op zoek te gaan naar de betrokken coderende genen die een rol spelen bij de afweer. Door op RNA of eiwit niveau een geïnduceerde plant te vergelijken met de niet-geïnduceerde plant verwachten we deze genen te vinden. We gaan daarbij zowel op zoek naar bekende afweergenen van andere planten zoals de PR genen (die betrokken zijn bij de gevonden route) als wel naar andere genen /eiwitten waarvan gevonden is dat ze een afweer tegen *Botrytis* kunnen geven zoals polygalacturonase inhibitor proteïns

(PGIP) en het defensieve PDF-1.2. Door middel van homologie zouden dergelijke genen bestudeerd en opgepikt kunnen worden (Johnson *et al.*, 1996).

Binnen dit project zijn verbindingen en methoden die bekend zijn uit de literatuur, getest in het proefstelsel *Botrytis tulipae* – tulp. De PAC heeft aangegeven dat zij geïnduceerde resistentie bij tulp het belangrijkste acht daar de vooruitzichten voor resistentieveredeling bij tulp minder gunstig zijn dan bij lelie. Het zwaartepunt van de activiteiten lag dan ook bij tulp. Daar het seizoen, waarin tulpenexperimenten uitgevoerd konden worden, beperkt is, werd buiten de tulpenperiode het onderzoek aan lelie voortgezet.

Op PPO-Lisse worden al diverse commerciële middelen getoetst op werking tegen *Botrytis* of andere pathogenen. PPO heeft haar ervaring van de bestrijding van *Botrytis* kortgesloten met PRI zodat er geen dubbel werk gedaan werd.

#### *Veredelings- en merkeronderzoek (30 % van de inzet)*

Naast de bovengenoemde nieuwe richting van onderzoek is ook de ingezette onderzoekslijn van de verschillende veredelingsaspecten voortgezet. Zoals bekend verloopt dit soort onderzoek bij lelie en tulp traag door de lange generatietijd en geeft het een meerwaarde om de ingeslagen richtingen af te ronden of voort te zetten totdat er duidelijke conclusies getrokken kunnen worden.

#### *Lelie*

In lelie is hoge mate van resistentie gevonden binnen de Orientals. Deze resistentie kan goed benut worden in het hele assortiment door hybriden te maken met bijvoorbeeld de gevoelige Aziaten. Om het succes van deze benadering te toetsen zijn enkele nieuwe OA hybriden gemaakt. Dit materiaal zal gebruikt worden om in een later stadium vast te stellen hoe de resistentie uitsplitst en of het mogelijk is om via de ontwikkelde bladtop-resistentietoets te testen of al in een vroeg stadium de resistente nakomelingen te selecteren zijn.

Tevens zal de leliepopulatie die nu gebruikt wordt binnen het project 'Indirecte selectie op TBV en *Fusarium* bij lelie en tulp' getoetst worden op resistentie tegen *Botrytis* en wordt onderzocht of deze populatie bruikbaar is voor het ontwikkelen van merkers gekoppeld aan *Botrytis* resistentie.

#### *Tulp*

In tulp zijn binnen het *T. gesneriana* assortiment in enkele gevallen (Bellona, Generaal de Wet, Ile de France) redelijke niveaus van resistentie in blad en bloem gevonden die op het veld van grote waarde kunnen zijn. PPO-Lisse en Plant Research International zien de resistentie van Bellona als zeer waardevol aangezien de hoge mate van veldresistentie een aanzienlijke reductie in bespuitingen met BoWas kan opleveren. Op aangeven van de PAC zal het onderzoek in de resistentieveredeling met *T. gesneriana* zich beperken tot het meest noodzakelijke vanwege de te lage resistentieniveaus. Er dient enkel vastgesteld te worden hoe, in al bestaande, nog niet bloeibare populaties, de resistentie van bijvoorbeeld Bellona en Ile de France overerft (in RxV populaties). Ook wordt onderzocht of een hogere mate van resistentie bereikt kan worden door RxR kruisingen (bijvoorbeeld Bellona x Ile de France). Daarnaast kunnen de populaties met Bellona ook waardevolle informatie gaan opleveren over de overerfbaarheid van pokken (bloem) resistentie. In het laatste jaar van dit project (2003) zullen enkele bloeibare populaties getoetst worden op resistentie met de ontwikkelde planttoets en bloemtoets. Hierna kan pas een sluitend oordeel gegeven worden of resistentieveredeling op *Botrytis* binnen *T. gesneriana* zinvol is.

## Materiaal en Methoden

### *Botrytis* opkweek

Voor het vermenigvuldigen van *Botrytis* is gebruik gemaakt van een standaard Malt Broth Agar (MA). Hier werd soms ook een fijngemalen hoeveelheid lelieblad (~150 g/l) aan toegevoegd om *Botrytis tulipae* en *B. elliptica* een extra groeistimulans te geven. De kweek werd onder constant UV-licht gehouden. Voor *B. elliptica* werd ook bijgelicht met wit licht. Na ~2 weken groei waren de platen klaar voor gebruik. Er werd enkele malen overgezet van de oude planten af, maar om de 2 maanden werden nieuwe glycerolstocks gebruikt voor de aanenting. De isolaten zijn labstocks welke aanwezig zijn op PRI en afkomstig waren van PPO-Lisse

Bij het oogsten van *Botrytis* conidia van de plaat werden met 5 ml water en 0.05 % Tween-80 de conidia afgekrabd m.b.v. een Drigalski spatel. Het hydrofobe karakter van de conidia vereist hierbij de oppervlaktetenspanningverlager Tween-80. Vervolgens werd de suspensie over een kaasdoek gehaald om een zuivere conidiasuspensie over te houden. De concentratie van sporen in deze suspensie werd bepaald en daarna doorverdund tot  $2 \cdot 10^5$  conidia-ml<sup>-1</sup>. Dit komt overeen met 200 conidia per µl. In tegenstelling tot *B. cinerea* is geen toevoeging van sucrose of fosfaat nodig voor een succesvolle infectie. Ook kan de incubatie op kamertemperatuur van twee uur achterwege worden gelaten. Inoculatie werd meteen aansluitend aan de isolatie uitgevoerd.

### *Plantmateriaal*

Als uitgangsmateriaal zijn de tulpencultivars Christmas Marvel (CM), Leen van der Mark (LM) en Ile de France (IF) gebruikt (zie Figuur 1). Van lelie zijn onder andere de cultivars Connecticut King, Mont Blanc, Amarone en Sorbonne gebruikt (zie Figuur 2). De planten zijn onder standaardcondities opgekweekt zoals die op PRI gebruikelijk zijn. De experimenten met tulp zijn in de periode van eind januari tot begin mei uitgevoerd. De lelie-experimenten zijn tussen juni en september uitgevoerd. Bij de experimenten is voor een groeisynchronisatie gekozen waarbij de experimenten zijn uitgevoerd vlak voor de bloeiperiode van de gewassen.



*Figuur 1: v.l.n.r. de tulpencultivars Christmas Marvel (vatbaar), Leen van der Mark (matig resistent) en Ile de France (resistent). Rechts zijn de aangetaste tulpen te zien (5 d.p.i.).*





Figuur 2: v.l.n.r. de leliecultivars Amarone, Connecticut King, Sorbonne en Mont Blanc.

### Bioassays

Voordat er onderzoek aan geïnduceerde resistentie uitgevoerd kan worden is een bioassay voor *Botrytis tulipae* nodig. Hiervoor is gebruik gemaakt van de kennis die al aanwezig was op PRI (bladtoets lily, zie Figuur 3), maar ook van ervaring met *Botrytis cinerea* - tomaat. Er is gekozen voor verschillende benaderingen van de infectie. Onder andere via een afgesneden bladtop of een hele plant met bol. De bladtoets is geschikt voor het testen van *Botrytis* resistenties bij verschillende cultivars. Hierdoor kunnen grote aantallen planten in een relatief klein oppervlak getoetst worden onder geconditioneerde omstandigheden. De volgende bladtoets is voor tulp ontwikkeld voor het testen van *B. tulipae* resistentie: In een afsluitbare 'favoriet'-bak met op de bodem vochtig filtreerpapier worden 12-wells platen neergezet met daarin kraanwater. Hierin worden de bladtopjes geplaatst in veelvoud van zes in herhalingen. De blaadjes zijn niet rechtstreeks te infecteren, maar worden gewreven, of met een naald verwond. Vervolgens wordt er een druppel *B. tulipae* opgebracht en wordt de bak gesloten onder hoge luchtvochtigheid weggezet. Na 3-5 dagen worden de lesies gescoord. De score verliep op basis van de ontstane lesie. Er werd gescoord op absolute diametergrootte van de lesie (in mm), of aan de hand van een index waarbij vijf klassen gehanteerd worden, nl. 0 = geen uitgroei lesie; 1 = waterachtige lesie ter grootte van inoculatie druppel; 2 = necrotische lesie ter grootte van inoculatie druppel; 3 = necrotische lesie 3-5 mm; 4 = necrotische lesie 5-10 mm; 5 = necrotische lesie > 10 mm of lesie met myceliumvorming en sporulatie.



Figuur 3: Bioassay van lelieblaadjes in een 'favoriet' bak.

Het screenen van hele planten is voornamelijk gebruikt bij het testen van geïnduceerde resistentie in tulp. Hierbij werden tulpen met bol in een potje weggezet op een tableau in de kas welke geconditioneerd was voor vocht en temperatuur. Na deze planten te hebben behandeld met de te induceren stof zijn ze 1-6 dagen later gewreven of aangeprikt om de



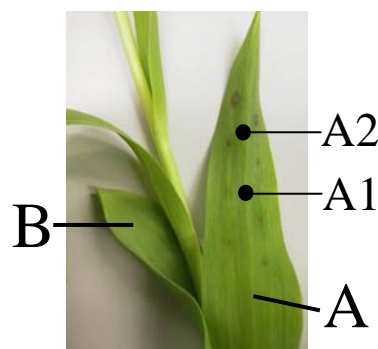
waslaag te verstoren. Vervolgens zijn de planten besproeid resp. bedruppeld met een conidiënsuspensie van *B. tulipae*. Na inoculatie werd de hele opstelling in een plastic tunnel geplaatst om met verdampingsapparaten een constante luchtvochtigheid van >93 % te handhaven (zie Figuur 4 en 5). Hierbij is temperatuur en relatieve luchtvochtigheid constant gemeten. Na 5-7 dagen zijn de planten vervolgens gescoord. Het scoren van de geweven en besproeide bladeren vond plaats aan de hand van een scoreindex. Deze liep van 0 (niet aangetast) tot 5 (volledig aangetast; myceliumontwikkeling en zelfs sporulatie; zie eerder). De score van de aangeprikte en bedruppelde bladeren verliep volgens het systeem dat bij de bladtoets werd beschreven.



*Figuur 4: Tunnel voor de toetsing van geïnduceerde resistentie bij tulp. Afgesloten compartimenten in een geconditioneerde kas met vernevelaars.*

Als interne controle voor aantasting is gebruik gemaakt van drie controlecultivars met een relatief bekende resistentie tegen *B. tulipae*. Ile de France (resistent), Leen van der Mark (intermediair) en Christmas Marvel (vatbaar) zijn in alle proeven meegenomen om als referentie te dienen en ter controle van de infectieusiteit van het gebruikte isolaat.

Onderzoek naar geïnduceerde resistentie in lelie verliep analoog aan dat van tulp. De grootte van de planten vereist echter een laboratoriumbenadering welke in de vorm van de bestaande bladtoets bereikt kon worden. Er is gekozen voor deze bladtoets omdat er in enkele pilotexperimenten goede resultaten bereikt zijn. Bij de toets voor lelie hoeft het blad niet geweven of geprikt te worden. Wel bleek dat de adaxiale zijde van het blad onder deze condities niet of nauwelijks te infecteren was. Bij de abaxiale zijde was er echter geen beperking.



*Figuur 5: Inoculatiepunten van tulpen. Blad A is het bovenste grote blad en blad B het onderste. Beide bladeren hebben twee inoculatiepunten 1 en 2.*

### Geïnduceerde resistentie assays

Voordat de gebruikte componenten worden besproken voor het induceren van een resistentie, zal eerst in het kort worden ingegaan op de verschillende resistentieroutes.

Grofweg zijn er drie routes bekend welke een induceerbaar karakter hebben en tot gevolg hebben dat resistentie tegen een bepaald pathogeen wordt opgewekt. Deze zijn de Jasmonzuur route (JA), de Salicylzuur route (SA) en de Stikstofoxide route (NO). Deze worden door resp. Jasmonaat/ethyleen, Salicylaat en Stikstofoxide geïnduceerd. Voor meer informatie over specifieke toepassingen wordt onder andere verwezen naar (Pieterse & van Loon, 1999, Pieterse *et al.*, 2001, Ton & Mauch Mani, 2004).

Bij het aanbrengen van de stoffen die verondersteld worden een inductie van resistentie te bewerkstelligen is een zodanige concentratiereeks gekozen dat deze in ieder geval de in de literatuur vermelde effectieve concentratie omvat. Deze bevonden zich allen in de micromolaire tot millimolaire range. De formulering bestond uit water, tenzij de stoffen niet wateroplosbaar waren. In dat geval werd gekozen voor een ethanoloplossing. Hier is vervolgens ook rekening mee gehouden in de controlebehandeling.

In onderstaande tabel staan de stoffen en de geteste concentraties vermeld (Tabel 1).

Vervolgens worden de stoffen per stuk toegelicht op het veronderstelde werkingsmechanisme en route.

Naam	Afk.	M.W.	Opm.	Conc.1	Conc.2	Conc.3	Conc.4
Curcumine	CU	368,39	Sigma geelwortel	50 µM	0,1 mM	0,5 mM	1,0 mM
β-aminobutyric acid	BABA	103,12	Sigma	50 µM	0,1 mM	0,5 mM	1,0 mM
Arachidonic acid	AA	304,46	Sigma <i>P. infestans</i>	10 µM	100 µM	0,5 mM	1,0 mM
5-Chlorosalicylic acid	5CSA	172,6	Sigma	50 µM	250 µM	0,5 mM	1,0 mM
L-Arginine	ARG	210,66	Sigma	0,1 mM	1 mM	5 mM	10 mM
Rose Bengal	RB	1017,6	Sigma	0,1 mM	0,5 mM	1 mM	5 mM
Jasmonic acid	JA	224,3	Sigma	5 µM	10 µM	50 µM	100 µM
S-nitroso-N-acetylpenicillamine	SNAP	220,2	Sigma 10 mM P-buffer	10 µM	40 µM	0,1 mM	0,4 mM
Sildenafil citrate	SC	666,7	Viagra®	8 µM	80 µM	4 mM	8 mM
1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) + JA	ACC+ JA		Sigma Gemengd	0,5mM/ 50 µM	0,25 mM/ 50 µM	0,5 mM/ 25 µM	0,25 mM/ 25 µM
BION®	BION	210,30	=BTH 50%	25 µM	50 µM	0,1 mM	1 mM
Benzothiazole	BTH	136,18	Aldrich	10 µ	0,1	0,5	1
Paraquat	PQ		Actor N8124				
Nicotinic acid	NA		Drum tobacco	0,1 %	0,25 %	1 %	2,5 %
Mn Cl-4 H <sub>2</sub> O	MN	197,91	Sigma	10 µM	100 µM	0,5 mM	1 mM
Oxaalzuur	OX	126,07	Sigma	100 µM	0,5 mM	1 mM	5 mM
Ascorbinezuur	ASC	167,13	Sigma	5 mM	10 mM	-	-
Lignosulfaat	LS		Papierindustrie	30 µM	0,1 mM	0,5 mM	1 mM
Chitosan	CS			0,1 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml	5 mg/ml

Tabel 1: Chemische componenten en de gebruikte concentratiereeks voor onderzoek naar induceerbaarheid van resistentie in tulp en lelie.

Voor het vergroten van de opneembaarheid is ook gebruik gemaakt van uitvloeier Silwet L-77. Deze is op aanvraag van de fabrikant (Van Meeuwen Chemicals B.V. , Weesp) voor onderzoeksdoeleinden beschikbaar gesteld. Silwet L-77 is een oppervlaktespanningverlager op basis van organosilicone welke gebruikt wordt om bladeren met een waslaag te kunnen penetreren. Silwet is toegepast in een 0,015 % formulering in zowel werkzame stoffen als de controle.

In het toepassingsprotocol van geïnduceerde resistentie zijn een aantal variaties uitgetoet. Deze zijn vooral variaties in tijd tussen inductie en inoculatie, wel of geen uitvloeier etc.

**Curcumine** wordt gewonnen uit de geelwortel of *Curcuma*. Het is een stof die in de literatuur wordt beschreven als effectief in geïnduceerde resistentie (bijv. Anto *et al.*, 2002, Kim *et al.*, 2003).

**β-aminobutyric acid (BABA)** is een stof waar veel onderzoek naar is gedaan in relatie tot SAR (systemic acquired resistance, voor uitleg zie discussie). BABA zou resistentie moeten induceren tegen necrotrofe schimmels. Ook *Botrytis* zou met BABA geweerd kunnen worden. (Cohen, 2001, Zimmerli *et al.*, 2001)

**Arachidonic acid** is een elicitor welke geïsoleerd is uit de oomyceet *Phytophthora infestans*. Deze is in de interactie *P. infestans*-aardappel betrokken bij resistentie inductie (Garcia-Pineda & Lozoya-Gloria, 1999, Rozhnova *et al.*, 2001)

**5-Chlorosalicylic acid (5CSA)** is een analoog van salicylzuur. Deze vorm wordt geacht beter opneembaar te zijn en is wellicht een meer geschikte kandidaat voor de aanschakeling van de SA-route.

**L-Arginine** is de precursor van stikstofoxide. Bij aanschakeling van de stikstofoxide route wordt ook resistentie geïnduceerd. Aanvoer van deze precursor zou dus een stimulerende rol kunnen hebben op resistentie (Adak & Stuehr, 2001, Alderton *et al.*, 2001, Que *et al.*, 2002).

**Rose Bengal (RB)** is een inducer van reactieve zuurstof verbindingen (of reactive oxygen species, ROS), zoals peroxide. Door de inductie van de vorming van H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zou wellicht een inductie van resistentie verwacht kunnen worden bij de applicatie van Rose Bengal (Costet *et al.*, 2002).

**Jasmonic acid (JA)** of de gemethyleerde vorm ervan (MeJA) is de stof die zijn naam heeft gegeven aan de jasmonzuurroute. Het is een van de meest bekende inducerende stoffen. JA (of MeJA) activeren, net als ethyleen, de jasmonzuurroute met daarin onder andere het PR-gen PDF-1.2 (Diaz *et al.*, 2002, Glazebrook *et al.*, 2003, Liechi & Farmer, 2002)

**S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP)** is een remmer van guanylate cyclase enzymcomplex welke betrokken is in de NO-route. Remming dan wel stimulatie van het guanylate cyclase complex zou een effect moeten hebben op resistentie indien de NO-route actief is tegen *Botrytis*.

**Sildenafil citrate** is de werkzame stof in Viagra<sup>®</sup>. Ook sildenafil citrate is werkzaam op het guanylate cyclase complex waarbij de werking berust op het verminderd afbreken van cyclisch GMP.

**1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) + JA** is een mengsel van de ethyleen precursor ACC en jasmonzuur. Deze twee stoffen zijn beide inducers van de jasmonzuurroute (zie jasmonic acid).

**BION<sup>®</sup>** is een commerciële formulering van BTH welke door Syngenta op de markt is gebracht in onder andere Duitsland en Amerika (onder de naam Actigard<sup>®</sup>). In Duitsland is het van de markt gehaald zodat het in Europa niet meer te verkrijgen is (zie BTH).

**Benzothiazole** of BTH is een synthetisch salicylzuur. Met salicylzuur op tabak is oorspronkelijk het fenomeen 'geïnduceerde resistentie' ontdekt. BTH is een actievere vorm van salicylzuur die makkelijker door blad wordt opgenomen (Bigirimana & Hofte, 2002, Govrin & Levine, 2002, Suo & Leung, 2001).

**Paraquat** is een toepassing met een andere benadering. Bij hoge concentraties wordt er vanuit de plant actieve zuurstof (ROS) vrijgemaakt waardoor de plant van binnen uit afsterft. Deze eigenschap maakt het een goede toepassing in de herbicidenhoek. Omdat zuurstofradicalen als trigger worden gezien van resistentieroutes, is het mogelijk dat een minieme hoeveelheid paraquat wellicht een niet-lethale dosis zuurstofradicalen vrijmaakt waardoor een geïnduceerd resistentiemechanisme in werking zou treden. Verder is nitriet oxide ook in staat om paraquat af te breken. De NO-route zou door de toevoeging dus ook geactiveerd kunnen worden. (Hung *et al.*, 2002, Manners *et al.*, 1998, von Tiedemann, 1997).

**Nicotinezuur** is gebruikt als een extract van tabak. Nicotinezuur is vermeld als een mogelijke inducer.

**Mangaan chloride** ( $MnCl_4 \cdot 4 H_2O$ ) levert met mangaan( $2^+$ ) een co-factor voor de enzymatische omzetting van oxaalzuur door oxalaat oxidase. Bladbemesting met mangaan wordt reeds toegepast in de sierteelt. Er zouden ook verhogingen in resistentie gerapporteerd zijn (Druka *et al.*, 2002, Segarra *et al.*, 2003, Woo *et al.*, 2000).

**Oxaalzuur** is het zuur dat *Botrytis cinerea* uitscheidt bij de pathogenese op planten. Het ligt in de lijn der verwachting dat *B. tulipae* en *B. elliptica* dit ook doen. Om een *Botrytis* aanval te simuleren is voor oxaalzuur gekozen (Cessna *et al.*, 2000, Lane, 2002, Ramalingam *et al.*, 2003).

**Ascorbinezuur** (vitamine C) is een scavenger van zuurstofradicalen. In de literatuur is beschreven dat de ascorbinezuurspiegel daalt als reactie op een pathogeen. Door externe aanbieder van ascorbinezuur zou de buffer voor ascorbinezuur groter worden waardoor scavenging van zuurstofradicalen vanuit het pathogeen op peil blijft (Gil-Ad *et al.*, 2000, Muckenschnabel *et al.*, 2002, Muckenschnabel *et al.*, 2003). Verder is ascorbinezuur ook een precursor van oxaalzuur.

In verband met een nieuwe hypothese over de rol van oxaalzuur (uitgescheiden door *B. cinerea*) en de werking van het enzym oxalaat oxidase (OxO of germin) wat tot op heden alleen geïdentificeerd is in monocotylen, is ook oxaalzuur en mangaanchloride getest voor de opwekking van resistentie (Berna & Bernier, 1999, Bernier & Berna, 2001, Donaldson *et al.*, 2001, Lane, 2002). Het idee is dat *B. cinerea* een oxaalzuur uitscheidt en dat *B. cinerea* alleen dicotyle plantenfamilies (~240) kan aantasten (Prins *et al.*, 2000). Gekoppeld met het gegeven dat oxalaat oxidases alleen in monocotyle planten aangetroffen zijn (Lane, 2002, Simmonds *et al.*, 2004, Vuletic & Šukalovic, 2000), zou de relatie OxO-oxaalzuur een belangrijke rol kunnen spelen in de interactie tussen *B. elliptica*/lelie en *B. tulipae*/tulp.

#### *Veredelingsonderzoek tulp*

In het recente verleden is binnen Plant Research International onderzoek verricht naar het opsporen van variatie voor *Botrytis* resistentie binnen tulpen cultivars. De cultivars en genotypen welke het meest resistent bleken zijn *Tulipa tarda*, 'Flair', 'Johann Strauss', 'Generaal de Wet', 'Duc van Tol Cochineal', 'Duc van Tol Cramoisi' en 'Bellona'. *T. tarda* is niet kruisbaar met het commerciële tulpen assortiment, maar heeft wel de hoogste en meest absolute resistentie tegen *B. tulipae*. Ook van een honderdtal botanische accessies is de *Botrytis* resistentie bepaald, waaronder accessies van *T. kaufmaniana*, *T. greigii* en *T. albertii*. Kruisingen zijn in het verleden uitgevoerd tussen resistente en vatbare genotypen en deze zijn momenteel in de doorteeltfase. Dit zijn de RxR populaties van 'Bellona' x 'Ile de France' en RxV populaties. Na de selectie voor kloonpopulaties worden deze getest op *Botrytis* resistentie.

#### *Veredelingsonderzoek lelie*

Bij de bepaling van de bestaande resistentie tegen *B. elliptica* in de leliecollectie op PRI is gebruik gemaakt van de bladtoets zoals beschreven onder 'Bioassays'.

Voor het merkerwerk is gebruik gemaakt van een bestaande populatie van de kruising 'Connecticut King' x 'Orlito'. Van de ouders en de ca. 100 nakomelingen is het resistentieniveau tegen *Botrytis* in twee verschillende toetsen bepaald. In een ander project (zie eindrapportage PT10314: Indirect selectie in lelie en tulp met moleculaire merkers) is een genetische kaart gemaakt die gebruikt kon worden voor het zoeken van de genetische positie van factoren met een rol in de *Botrytis* resistentie. Hoewel dit niet de meest ideale

populatie was om onderzoek aan *Botrytis* resistentie te doen was het wel de enige populatie die voorhanden en waar al veel vooronderzoek aan verricht was.

## Resultaten

### *Geïnduceerde resistentie tulp*

Over een periode van drie jaar is in de gewasspecifieke groeiperiode onderzoek gedaan naar de effecten van geïnduceerde resistentie. In 2001 zijn enkele gangbare stoffen *in duplo* getest op tulp zoals Bion<sup>®</sup>, MeJa, SA, AlCl<sub>3</sub> (aluminiumchloride), RB, LS, 5CSA en CS. Deze proef werd eerst uitgevoerd om de proefopstelling te testen en vervolgens om de verschillende werkingsmechanismen te testen. De tulpecultivars waren Ile de France, Leen van der Mark en Christmas Marvel. De experimenten zijn op hele planten uitgevoerd welke gekopt waren voor de bloei. De inductie vond plaats op t=0 d, de inoculatie op t=2 d en de score op t=8 d. Op Bion na werd in geen van de behandelingen een verschil waargenomen ten opzichte van de controleplanten die alleen met water waren besproeid.

In 2002 zijn het merendeel van de stoffen volledig getest. Vooral Bion is goed onderzocht op zijn werkingsspectrum. Er is gevarieerd in tijdsinterval tussen inductie en inoculatie (2-7 dagen). Ook is er geprikt/gedruppeld en gewreven/gesproeid als inoculatiemethode. De resultaten van Bion uit 2001 bleken niet reproduceerbaar. Van de stoffen paraquat en Rose Bengal bleken de effecten op de toetsplanten dermate desastreus dat deze componenten niet meer gebruikt zijn. Alle andere stoffen bleken niet een induceerbare werking te hebben op de resistentie van tulp tegen *Botrytis tulipae*.

Van een behandeling met Bion en ACC/JA is over verschillende periodes blad bemonsterd voor RNA isolatie. Hiermee kan op een northern blot de transcriptieniveaus van de PR-genen PR-1 en PDF-1.2 aangetoond worden. Nodig is dan als sonde ('probe') een stukje DNA sequentie van deze genen, bij voorkeur uit tulp (of lelie, zie verderop) of uit andere soorten, die dan wel moet kunnen hybridiseren (interactie vertonen) met de tulp (lelie) vertegenwoordigers van die genen. Omdat er geen probes/primers beschikbaar zijn voor tulp, is met behulp van *Arabidopsis*-specifieke primers voor PR-1 en PDF-1.2 (Corné Pieterse, UU) getracht de homologen in tulp te amplificeren. Helaas is dit niet gelukt, mogelijk vanwege de genomgrootte van tulp of omdat er onvoldoende overeenkomst is tussen tulp en *Arabidopsis*. Daarom is deze lijn niet verder vervolgd in het kader van dit project.

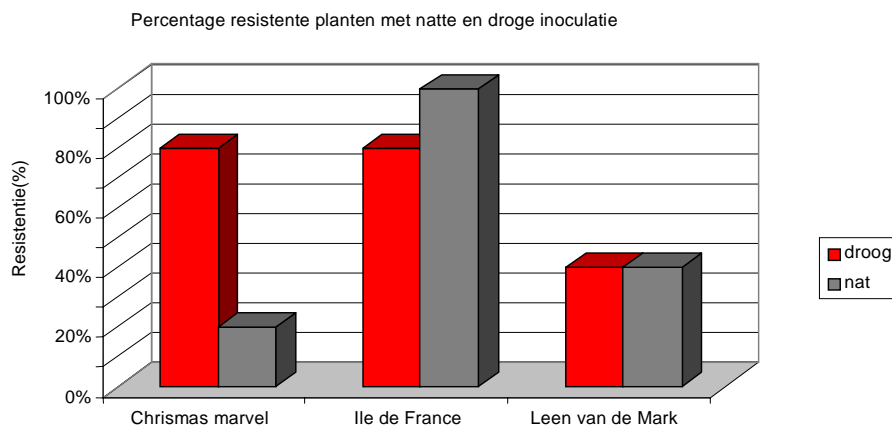
In 2003 zijn nog enkele stoffen getest. Hierbij is de cultivar Christmas Marvel weggelaten omdat de kwaliteit ervan te wensen overliet. Ook zijn er variaties gemaakt met de toevoeging van de uitvloeier Silwet L-77. In Figuur 6 is te zien dat er een (tijdelijke) permeabiliteit optreedt aan het oppervlak van het tulpenblad. Donkere plekkjes zijn als gevolg van de verneveling van water met Silwet waar te nemen. Na 5-10 minuten is het visuele effect verdwenen.





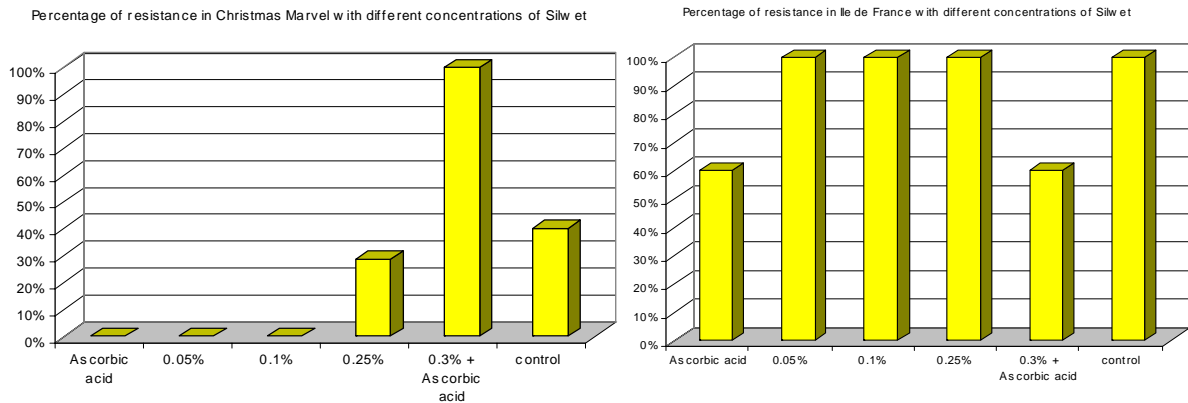
*Figuur 6: Effecten van Silwet L-77 op het blad van tulp.*

Als een variatie op de natte inoculatie is voor tulp ook een experiment in duplo uitgevoerd waarbij droge conidia werden gebruikt voor de inoculatie. Het effect hiervan was opzienbarend. De indeling van de twee van de drie referentietulpen (Ile de France-Christmas Marvel = R:V) bleek niet lineair met de natte inoculatie (figuur 7). Christmas Marvel bleek de grootste toename in resistentie te hebben terwijl de IF iets af nam. LM bleef gelijk.

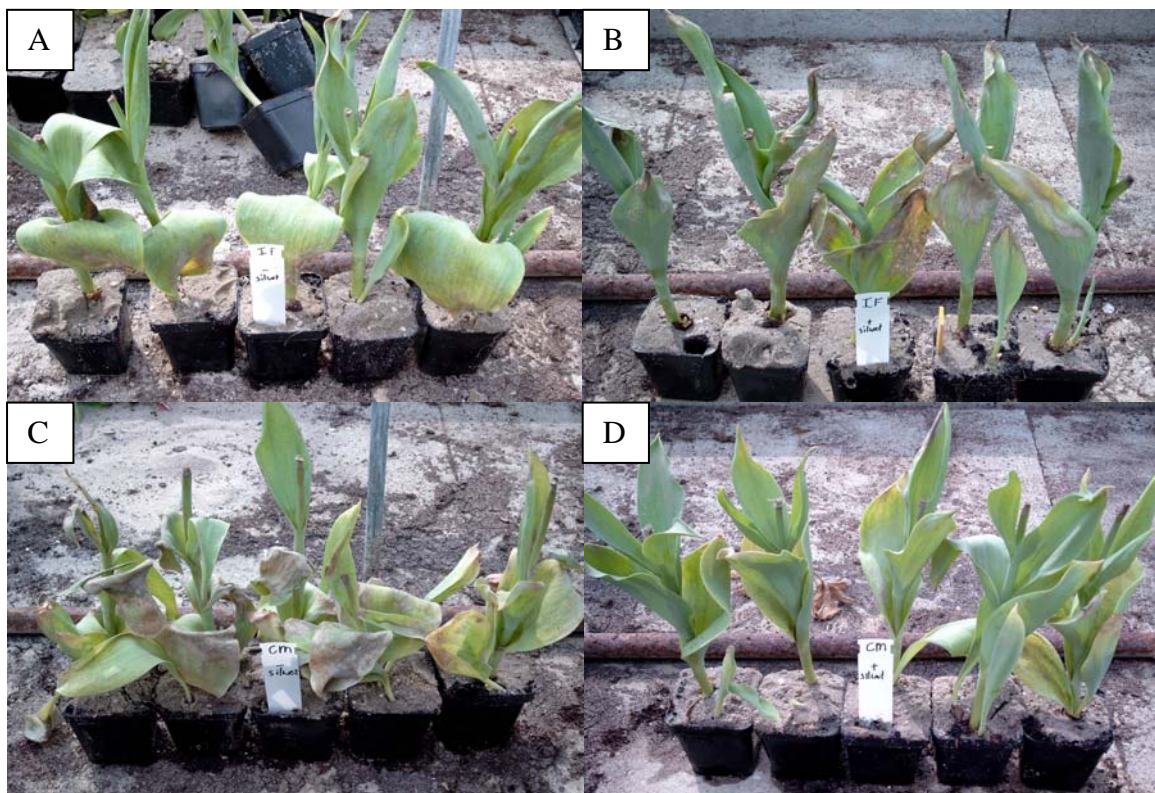


*Figuur 7: Droge vs. natte inoculatie bij drie tulpencultivars resulteren in verschillende resistentieniveaus.*

Ook de combinatie van 0,3 % Silwet L-77 met 5 mM ascorbinezuur gaf soortgelijke omgedraaide waarnemingen. De eerst resistente Ile de France is nu vatbaarder dan de vastbare Christmas Marvel (zie figuur 8 en 9).



Figuur 8: Variatie in resistentie bij behandeling met Silwet L-77 en 5 mM ascorbinezuur. Links: Christmas Marvel, rechts Ile de France.



Figuur 9: Applicatie van Ascorbinezuur in combinatie met Silwet L-77 geven omgekeerde resultaten voor resistentie. A) Ile de France zonder Silwet, B) Ile de France met Silwet, C) Christmas Marvel zonder Silwet en D) Christmas Marvel met Silwet.

Tevens zijn er bladextracten van Christmas Marvel en Ile de France gemaakt. De gedachte hierbij was dat CM dan wel IF een component zou kunnen bevatten dat infectie bevordert dan wel remt. Bij een applicatie van bladextract zou het effect op de andere cultivar tot uiting kunnen komen. Er zijn extracten van IF en CM in water gemaakt. Deze extracten zijn



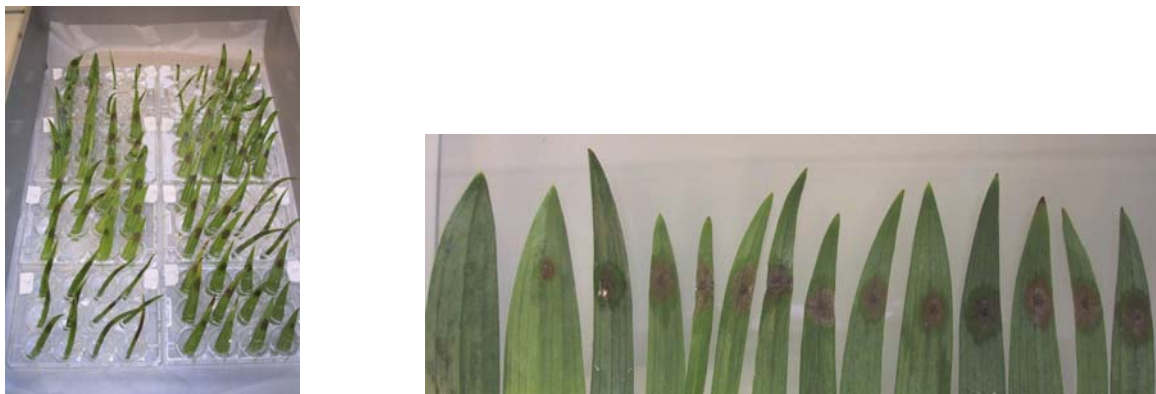
vervolgens over zowel CM als IF gesproeid als beïnvloedende factor. Uit deze experimenten bleek dat bij CM geen effect van de extracten waar te nemen was. Bij IF is er een tendens dat de met CM besproeiende planten een grotere aantasting te constateren was dan bij de met IF besproeiende IF (zie figuur 10).



Figuur 10: L) Christmas Marvel met extract van Ile de France (voor) en CM (achter). R) Ile de France met extract van IF (voor) en CM (achter).

#### Geïnduceerde resistentie lelie

Bij lelie is het onderzoek naar de induceerbaarheid van resistentie toegespitst op de bladoptoets. Inductie vond ook plaats op afgesneden blad (Figuur 11). Als standaardgevoelig is de Aziaat "Connecticut King" gebruikt bij de verschillende experimenten. De Oriental Sorbonne is *Botrytis*-resistent. Analooq aan de resultaten voor tulp bleek ook bij lelie geen effect van de behandelingen met de in de literatuur vermelde stoffen welke ingrijpen op de jasmonaat/ethyleen route of de salicylzuur route.

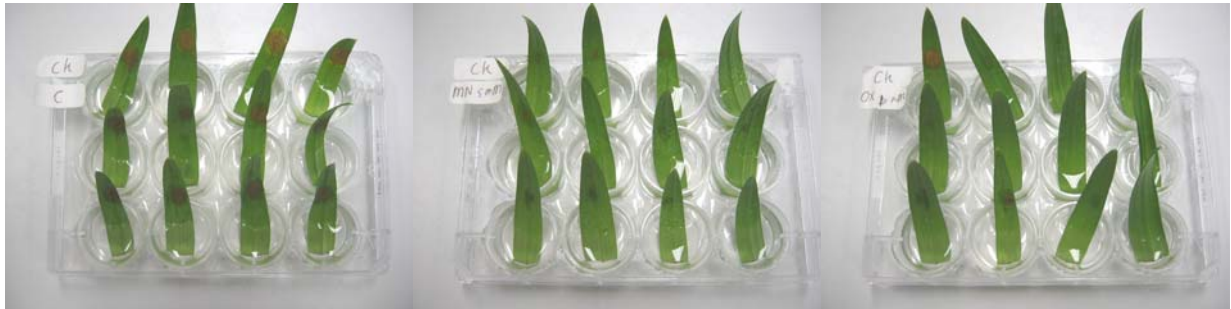


Figuur 11: Links is een assay in een 'favoriet'-bak te zien waarmee de inductie en inoculatie is uitgevoerd. Rechts een detailopname van ~1000 leliecultivars/nummers/rassen voor de inventarisatie van *B. elliptica* resistentie in bestaand materiaal.

Ook hier is na een behandeling met Bion en ACC/JA over verschillende periodes blad bemonsterd voor RNA isolatie. Hiermee kan op een northern blot de transcriptieniveaus van de PR-genen PR-1 en PDF-1.2 aangetoond worden Omdat er geen specifieke probes/primers beschikbaar zijn voor lelie, is met behulp van Arabidopsis-specifieke primers voor PR-1 en PDF-1.2 (Corné Pieterse, UU) getracht deze homologen in lelie te identificeren. Helaas is het niet gelukt om deze producten te verkrijgen, waarschijnlijk door de lage homologie op nucleotideniveau tussen Arabidopsis en lelie voor deze PR-genen. De aanwezige blots zijn dus niet gebruikt in dit onderzoek net als bij tulp.

Voor het testen van de relatie *Botrytis*-monocotylen met betrekking tot de afbraak van oxaalzuur door oxalaat oxidase zijn oxaalzuur en de co-factor mangaan chloride getest bij verschillende concentraties.

Bij de geteste cultivars Conn. King, Mont Blanc en Amarone zijn oxaalzuur (5 en 10 mM) en mangaan chloride (1 en 5 mM) opgebracht. Na een dag is vervolgens geïnoculeerd met *B. elliptica*. Zie Figuur 12.



Figuur 12: Connecticut King met watercontrole, 5 mM mangaanchloride en 10 mM oxaalzuur. Behandeling -1 d.p.i. Foto 3 d.p.i.

De resultaten van de experimenten met 'Amarone' en 'Mont Blanc' zijn op identieke manier uitgevoerd als bovenstaande foto's in figuur 12. De resultaten zijn vergelijkbaar, maar minder uitgesproken. Daarom is CK als model genomen.

#### Veredelingsonderzoek tulp

Er zijn diverse jeugdfasetoetsen op kruisbaarheid onderzocht. Hierbij zijn verschillende zaailingjaren bekeken. Vanaf het derde jaar blijkt toetsen zinvol. Voor die tijd zijn zaailingen extreem vatbaar en geven geen uitsplitsing in resistent en vatbaar. Er zijn sterke aanwijzingen verkregen dat de epicuticulaire waslaag een bepalende rol speelt in de resistentie tegen *Botrytis*.

#### Veredelingsonderzoek lelie

In het eerder uitgevoerde project: Indirect selectie in lelie en tulp met moleculaire merkers ( zie eindrapportage PT10314 ) is met behulp van de nakomelingen van de kruising 'Connecticut King' x 'Orlito' een genetische koppelingskaart gemaakt. Deze genetische kaart wordt verderop in figuur 14 gegeven en de procedure hoe deze kaart verkregen is wordt in de informatiebox hiernaast kort beschreven.

Hoewel de ouders van deze kruising beide redelijk gevoelig waren voor *Botrytis* aantasting hadden we in de afgelopen jaren toch nakomelingen gezien met lagere en hogere aantastingsverschijnselen. Daarom is besloten deze populatie tweemaal op

#### Genetische koppelingskaart in lelie:

1. DNA isolatie van 98 nakomelingen van de kruising 'Connecticut King' x 'Orlito'
2. Amplified Fragment Length Polymorfisme (AFLP) -procedure met zes of zeven selectieve basen
3. 15 AFLP enzym-primer combinaties, met gemiddeld 80-120 fragmenten
4. In totaal 527 segregerende, scorebare AFLP merkers te krijgen
5. 176 merkers waren afkomstig van 'Connecticut King' en 201 van 'Orlito'; de overige 150 merkers waren in beide ouders (heterozygoot) aanwezig
6. Er is een kaart gemaakt van alle Con. King merkers en de merkers die in zowel Con. King als Orlito aanwezig zijn. 251 van deze 326 uitsplitsende merkers konden geplaatst worden in koppelingsgroepen met minimaal 5 merkers

*Botrytis*resistentie te toetsen en te kijken of er met de ziektescores en de moleculaire merkers associaties gevonden kunnen worden (Quantitative Trait Loci; QTL's)

Het gaat hier om de kruising 'Connecticut King' x 'Orlito'. Orlito is één van de nakomelingen van de kruising 'Connecticut King x Pirate'. In 2001 is de *Botrytis* resistentie van de individuen in de nakomelingenpopulatie gemeten. In totaal zijn 3 metingen verricht. Per meting werd de lesiediameter op 6 bladtopjes bepaald en het gemiddelde ervan. De gemiddelde diameter op 'Pirate' bladmateriaal was 20,8 mm, op 'Connecticut King' 12,5 mm en op 'Orlito' 12,4 mm. 'Connecticut King' is duidelijk de meer resistente ouder in de kruising 'Connecticut King' x 'Pirate' en 'Orlito' heeft hetzelfde niveau van resistentie als 'Connecticut King'. In 2002 zijn deze resistentietoetsen herhaald door van elk individu 12 blaadjes te testen op *B. elliptica* resistentie m.b.v. de beschreven bladtoets maar in 2002 is niet de diameter gemeten maar is de aantasting in klassen bepaald: Geen uitgroei lesie = klasse 0, waterachtige lesie ter grootte van inoculatie druppel = 1, necrotische lesie ter grootte van inoculatie druppel = 2, necrotische lesie 3-5 mm = klasse 3, necrotische lesie 5-10 mm = klasse vier, necrotische lesie >10 mm of lesie met mycelium ontwikkeling is klasse 5.

De toetsen zijn lastig te reproduceren door allerlei externe factoren (leeftijd biologisch materiaal, inoculatiemix, externe omstandigheden etc). De correlatie tussen de eerste en tweede toets in 2001 was nog redelijk ( $r^2 = 0.67$ ), tussen de eerste en derde en tweede en derde al minder ( $r^2 = 0.46$  resp.  $0.51$ ). De correlatie tussen de diameter toetsen van 2001 en de klassen van 2002 waren lager dan 0.4.

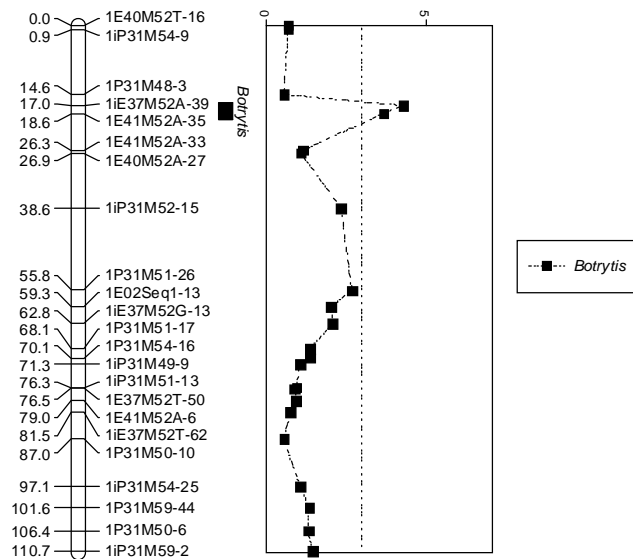
Door de moeilijke reproduceerbaarheid van de toetsen werden bij de QTL-analyse alleen significante QTL's geaccepteerd die in 2 of meer onafhankelijke toetsen een significant effect gaven. De tabel laat de waarden zien voor de kandidaat QTL's; als er in één van de twee jaren een associatie lijkt te zijn is ook gekeken of in het andere jaar deze associatie misschien over het hoofd gezien doordat de waarden daar lager waren.

Dit resulteerde in zeven verschillende, significante QTL's. Vijf op de 'Connecticut King' kaart en twee op de 'Orlito' kaart (zie Tabel 2). De 'Connecticut King' merkers zijn in koppeling met de resistentie en de 'Orlito' merkers in afstoting.

De diametermethode in 2001 gaf betere associaties tussen merkers en aantasting en is dus waarschijnlijk een betrouwbaarder meting. Veel van de in dat jaar gevonden significante associaties werden echter niet teruggevonden in het jaar daarop. Bij de aanwezigheid van de QTL vermindert de diameter van de lesies met ongeveer 2 tot 2.5 mm. De meest significante associatie in 2002 (E37M52A-39; zie ook Tabel 2) was totaal afwezig in 2001. Alleen het effect op koppelingsgroep 4 komt in beide jaren met beide methoden met beide methoden zichtbaar. Bijna alle merkers zijn in koppelingsfase met de resistentie (als de merker aanwezig is de plant minder gevoelig).

Over de projectperiode is ook een inventaris gemaakt van de leliecollectie welke op PRI wordt onderhouden. Het gaat om een collectie van ongeveer 1000 lelie-genotypen met vertegenwoordigers (rassen, species) uit alle secties van het geslacht *Lilium*. In *duplo* werd de relatieve *B. elliptica* resistentie bepaald. Hier is gebruik gemaakt van de bladtoets zoals eerder beschreven.

## ConKing1



*Figuur 13: Koppelingsgroep 1 van de 'Con. King' kaart en de plaats van de merkers in cM. Het figuur ernaast laat zien waar het QTL-betrouwbaarheidsinterval op de koppelingsgroep gelokaliseerd is (merkers met een significantieniveau hoger dan 3).*

Zowel de significantieniveaus berekend met een Kruskal-Wallis analyse als de LOD-scores worden gegeven op de merker met de hoogste waarde.  $ll : m = 2.6 : 1.9$  betekent dat zonder de merker de gemiddelde klasse 2.6 was en met merker 1.g (dit in 2002 toen in klassen gescoord is).  $ll : lm = 15.4 : 12.9$  betekent dat zonder merker de gemiddelde lesie 15.4 mm was en met merker 12.9 (dit in 2001 toen in de grootte van de lesies in mm gemeten is). Er zijn 21 koppelingsgroepen die corresponderen met 12 chromosomen. Zowel 'Con. King' specifieke merkers als merkers als gemeenschappelijke merkers staan in de kaart. De 'Orlito' specifieke merkers staan niet in de kaart.

Op de volgende twee pagina's is weergegeven:

*Tabel 2: Alle associaties tussen Botrytisresistentie en merkersegregatie die in meerdere onafhankelijke metingen gevonden zijn.*

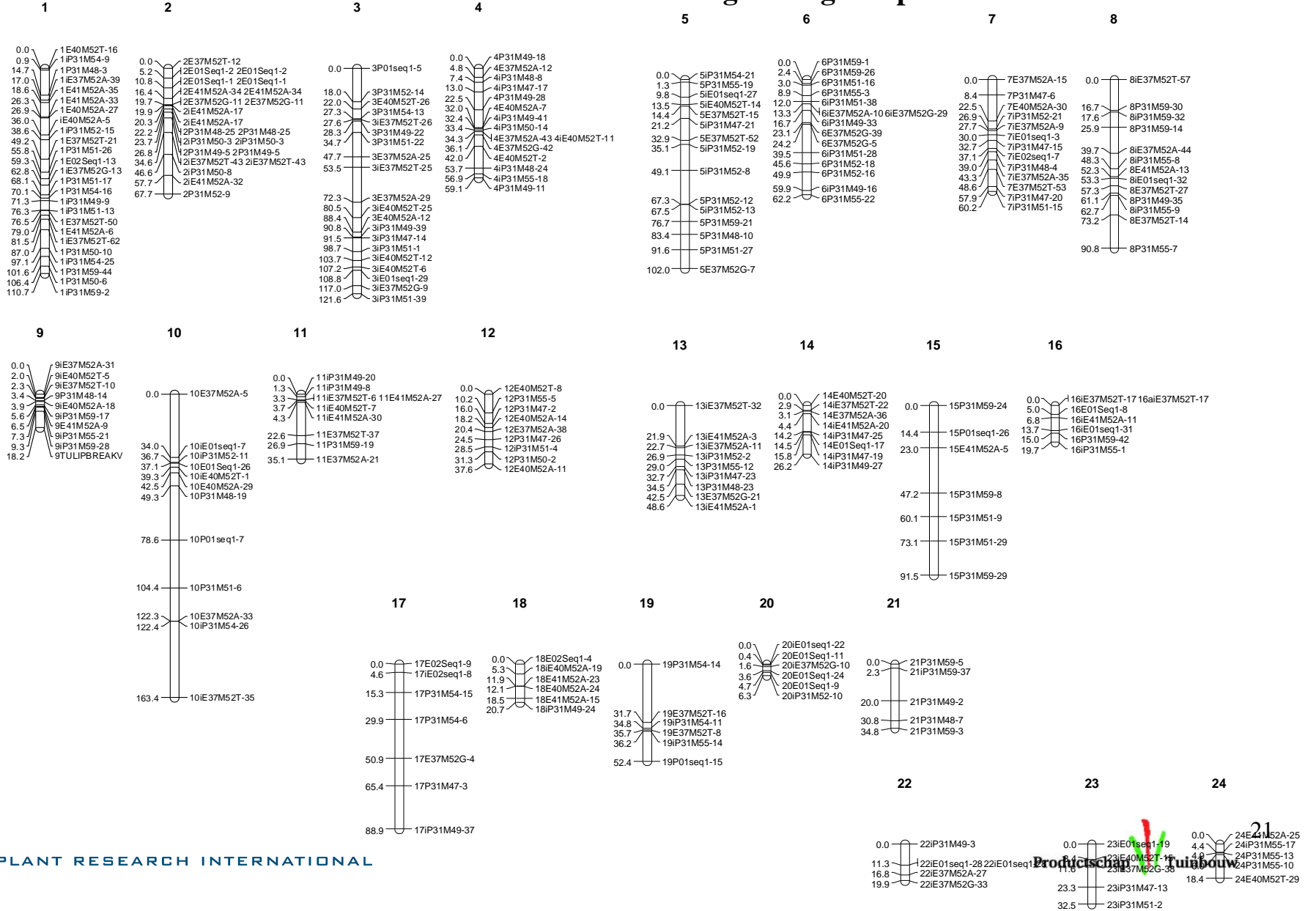
*Figuur 14: De genetische koppelingskaart van de 'Con. King' ouder.*

'Con. King' - kaart			KW-significantie	LOD	Jaar	Effect
E37M52A-39	1	i	****	4.3	2001	ll : m- = 2.6 : 1.9
Geen significant effect in tweede meting en in andere jaren met diameter bladponsje						
E37M52G-42	4	ck	*****	2.5	2001	ll : lm = 15.4 : 12.9
1ste meting			**	1.2		ll : lm = 16.7 : 15.0
2e meting			*****	3.5		ll : lm = 14.2 : 10.8
3e meting			****	3.5		ll : lm = 16.0 : 13.5
E37M52G-42	4	ck	**	1.4	2002/1	ll : lm = 2.3 : 1.8
Geen significant effect in tweede meting 2002						
E40M52T-14	5	i	****	2.1	2001	ll : m- = 15.7 : 13.4
1ste meting			**	2.0		ll : m- = 17.0 : 15.2
2e meting			***	2.8		ll : m- = 14.3 : 11.5
3e meting			***	1.9		ll : m- = 17.1 : 13.9
Geen significant effect in metingen 2002						
Merker LMoV-resistentie	9	i	***	1.7	2001	ll : m- = 14.9 : 13.9
1ste meting			****	2.9		ll : m- = 16.9 : 14.8
2e meting			****	3.2		ll : m- = 13.7 : 11.3
3e meting			ns	0.7		ll : m- = 15.3 : 14.0
Geen significant effect in metingen 2002						
P31M59-19	1 1	ck	****	2.8	2002/1	ll : lm = 2.5 : 1.8
Geen significant effect in tweede meting 2002 en in andere metingen van 2001						

'Orlito' kaart			KW-significantie	LOD	Jaar	Effect
E37M52T-54	2	Or	****	1.2	2001	nn : np = 13.2 : 15.2
1 <sup>ste</sup> meting			****			nn : np = 14.9 : 16.9
			***			nn : np = 11.6 : 13.7
			***			nn : np = 13.9 : 15.7
E37M52T-54			**		2002/2	nn : np = 3.8 : 4.0
Geen significant effect in meting met diameter bladponsje eerste meting 2002						
P31M55-21	17	i	****	1.4	2001	nn : p- = 15.8 : 13.5
1ste meting			**			nn : p- = 17.0 : 15.3
2e meting			*****			nn : p- = 14.5 : 11.6
3e meting			****			nn : p- = 15.9 : 14.1
Geen significant effect in metingen in 2002						



# The 'Connecticut King' linkage map



## Discussie

Van het onderzoek naar geïnduceerde resistentie bij verschillende gewassen door toediening van chemicaliën is in de literatuur veel melding gemaakt (Cohen, 2001, Van Loon, 1997, Pieterse *et al.*, 2001, van Wees *et al.*, 2000). Ook voor resistentie tegen *Botrytis* zijn er diverse onderzoeken beschreven, al dan niet met wisselende resultaten (Audenaert *et al.*, 2002, Chen & Huang, 1997, Govrin & Levine, 2000, Govrin & Levine, 2002, Krahl & Randle, 1999, Kulek & Floryszak Wieczorek, 2002, Mercier *et al.*, 2000, Murphy *et al.*, 2000, Patykowski & Urbanek, 2003, Zimmerli *et al.*, 2001). Als basis dient het aanschakelen van de jasmonzuurroute of de salicylzuurroute in dicotyle planten. Ondanks dat er in de praktijk nog weinig toepassingen te vinden zijn, leek het systeem veelbelovend voor een nieuwe en milieuvriendelijke aanpak van pathogenen bij de teelt van (sier)gewassen. Omdat in de bollenteelt een grote schadepost te verwachten valt als gevolg van de aangekondigde beperkingen op het gebruik van fungiciden, is de mogelijkheid onderzocht om dit te compenseren door de toepassing van deze geïnduceerde resistentie bij bolgewassen. Om de inductie van resistentie te kwantificeren is het noodzakelijk om over een goed screeningsprotocol te beschikken om de graad van aantasting op laboratoriumschaal te kunnen volgen. Hiervoor is op PRI gebruikt gemaakt van de bladtoets (tulp en lelie) en een assay waarbij de hele plant wordt gebruikt voor inoculatie (tulp). De toetsen zijn ontwikkeld om op een bepaald tijdstip een uitspraak te doen van de relatieve resistentie ten opzichte van referentiecontroles. Er dient echter wel opgemerkt te worden dat de tijd van het jaar (en dus de fysiologische toestand van het plantmateriaal) en de fysiologische toestand van het *Botrytis* isolaat niet constant zijn. Voor de experimenten als hier uitgevoerd zijn het goede en toepasbare toetsen. De criteria zijn aan de hand van een index vastgelegd waardoor een simpele score met een schaal van 0-5 de aantasting weergeeft. Ook is er met een schuifmaat gemeten om de lesie diameter (mm) weer te geven. Per cultivar zijn vier planten gebruikt per concentratie per stof. Per plant zijn twee bladeren met elk twee meetpunten gebruikt waardoor 16 meetpunten konden worden bepaald. Bij de totale besproeiing van planten zijn per plant twee bladeren gescoord. Deze variaties in inoculatie en scoring bleken geen aanleiding te zijn tot onderlinge verschillen. Prikken en druppelsgewijs inoculeren is tijdrovend, maar bij besproeiing van totaal blad moet blad gewreven worden, wat ook tijdrovend is.

Met een goede bioassay en een ziekte-index is vervolgens onderzocht welke route aangeschakeld wordt. In dit onderzoek is gekozen om een heel spectrum van mogelijk inducerende stoffen te screenen op de interacties tussen tulp-*B. tulipae* en lelie-*B. elliptica*. Gezien de praktische toepasbaarheid van uitkomsten van dit onderzoek is het goed de term 'geïnduceerde resistentie' of 'systemically acquired resistance (SAR)' nader te definiëren. Bij een zuivere SAR wordt een plant op een bepaald deel aangeschakeld door een component. Vervolgens verplaatst een signaal zich systemisch door de plant waardoor de hele plant vervolgens resistent(er) wordt tegen een pathogeen.

In dit huidige onderzoek is uitgegaan van een situatie waarbij de hele plant wordt behandeld met een besproeiing van de component. Hierdoor is de systemische factor komen te vervallen. Uit de onderzoekresultaten is naar voren gekomen dat de geteste componenten (onder de condities zoals getest in dit onderzoek) in geen van de gevallen een efficiënte resistentie tegen *B. tulipae* in tulp, of een resistentie tegen *B. elliptica* in lelie kunnen opwekken. Een mogelijke verklaring is de complexiteit van factoren die meespelen in deze interactie. Ook is het feit dat *Botrytis* een necrotroof is, speelt mee in de minder optimale weerstand tegen *Botrytis*. Tegen een biotroof is de strategie om een necrotische lesie rondom het punt van infectie aan te leggen een goede aanpak; een biotroof kan namelijk alleen op levend weefsel leven en zal door de necrotische inperking in de expansie geremd worden.



Een necrotroof echter, kan op zowel levend als dood weefsel groeien. Toch was er vanuit de literatuur aanleiding deze aanpak te proberen.

Verder is ook duidelijk geworden dat de tot nu toe gebruikte classificatie van de gesteste cultivars, zijnde vatbaar voor CM, intermediair voor LM en resistent voor IF, alleen opgeld doet bij een natte inoculatie. Bij de uitgevoerde experimenten met een droge inoculatie bleek er voor LM geen verschil te zijn, terwijl CM een toename in resistentie gaf. IF had een lichte afname in resistentie.

Andere observaties waren dat IF geen nadelig effect van de oppervlaktetenspanningverlager Silwet L-77 ondervindt, maar wel van ascorbinezuur, terwijl CM een nadelig effect ondervindt op resistentie van Silwet en ascorbinezuur apart, maar in combinatie (0,3% + 5 mM) is de resistentie ongeveer het dubbele t.o.v. de controle.

Bij het experiment waarbij extracten van IF en CM zijn getest op activatie of remming van infectie, bleek dat extract van IF geen afname van infectie had op CM blad. Andersom leek het dat IF planten welke met CM extract waren behandeld, meer geïnfecteerd waren dan IF planten met IF-extract. Hieruit zou voorzichtig geconcludeerd kunnen worden dat CM eerder een 'vatbaarheidsfactor' heeft, dan dat IF een 'resistentiefactor' in zich heeft.

De condities waaronder de toetsen worden uitgevoerd, zijn dus erg belangrijk.

Hoewel er bij lelie weinig verschil was tussen de ouders van de nakomelingenpopulatie met betrekking tot gevoeligheid voor *Botrytis* infectie, was er wel een duidelijke uitsplitsing bij de nakomelingen. Dit was de reden om toch een koppelingsstudie uit te voeren (in aanmerking nemend dat er al een genetische koppelingskaart beschikbaar was). De toets is echter van zoveel omstandigheden afhankelijk dat er daardoor vaak geen of lage correlaties tussen de verschillende toetsen gevonden worden. Zonder een reproduceerbare toetsmethode blijft een QTL-analyse maar een tijdsopname. Er kunnen wel effecten gevonden worden maar die zullen niet altijd reproduceerbaar zijn en kunnen ook vals positieve effecten zijn. Wij zien zowel in 2001 als in 2002 enkele associaties met redelijke significanties. Effecten die in beide jaren gezien zijn zullen bevestigd moeten worden in onafhankelijke populaties (met dezelfde resistentiedonor) of in herhaald teruggekruist materiaal (met selectie op de marker). Het beste is een nakomelingschap te hebben die uitgaat van een duidelijk verschil tussen de ouders m.b.t. *Botrytis*resistentie en die ook geen terugkruisingspopulatie is zoals bovenbeschreven populatie. Het ontwikkelen van nieuwe populaties in lelie blijft echter een tijdrovende bezigheid vooral als moeilijke kruisingen uitgevoerd moeten worden en er ieder jaar maar weinig nakomelingen gegenereerd kunnen worden die dan ook nog vermeerderd moeten worden om enigszins betrouwbare toetsen uit te kunnen voeren. Bijvoorbeeld het opzetten van de nieuwe OA-hybride populatie is weinig succesvol gebleken. Er zijn uit de kruisingen van vorig jaar een beperkt aantal plantjes (ca. 20) ontstaan na embryocultuur die zijn uitgeplant in de kas. Daarna zijn op grotere schaal opnieuw bestuivingen uitgevoerd, waarvan het materiaal nog *in vitro* staat en er maar afgewacht moet worden wat de opbrengst aan nieuwe nakomelingen zal zijn. Daarnaast zijn in een ander project wel diverse AOA en OAA populaties verkregen die als nieuwe merkerpopulaties zouden kunnen dienen. Voor de inventarisatie van *B. elliptica* resistentie in de leliecollectie op PRI is ongeveer 80 % gescreend. In de geteste nummers is op deze manier inzicht verkregen in *Botrytis* resistentie zodat kruisingsouders makkelijk gekozen kunnen worden. De resistentie is bekeken ten opzichte van een resistente Oriental en een vatbare Aziaat. Omdat de bladvorm sterk verschilde binnen de collectie, zijn kleine scoringsonvolkomenheden ingecalculeerd. Hopelijk worden in de nabije toekomst ook alternatieve methoden ontwikkeld (bijv. met een genomics aanpak) die de biotoets, zoals die nu uitgevoerd wordt, wat minder cruciaal maken.

## Conclusies

### *Geïnduceerde resistentie*

In het project "Geïnduceerde resistentie tegen *Botrytis* in tulp en lelie" is onderzoek gedaan naar de induceerbaarheid van resistentie in bolgewassen. Door het toepassen van componenten met een veronderstelde werking op verschillende resistentieroutes zoals de Salicylzuurroute, Jasmonzuurroute en de Stikstofroute werd een verhoogde resistentie tegen *Botrytis* verondersteld. Bij de uitvoering van het project zijn een groot aantal componenten getest op werkzaamheid. Een groot aantal van deze stoffen waren reeds in de literatuur beschreven in relatie tot schimmels in het algemeen, of *Botrytis cinerea* in het bijzonder.

- ***Bij verschillende toetsen binnen en tussen groeiseizoenen bleek dat geen van deze stoffen in staat was om bij tulp en lelie tegen resp. B. tulipae en B. elliptica een resistentie te induceren (onder de geteste condities).***

### *Veredeling*

Een tweede doel van het project was onderzoek naar de aanwezige genetische resistentie in lelie. Met behulp van een kruisingspopulatie van lelie is gekeken naar de aanwezigheid van Quantitative Trait Loci (QTL's). Genetische factoren die een rol spelen in het resistentiemechanisme en zodoende eventuele verschillen in resistentie kunnen verklaren. Als dergelijke factoren geïdentificeerd zijn en in onafhankelijke experimenten bevestigd dan kan in het veredelingsproces op deze factoren geselecteerd worden met behulp van moleculair geassisteerde selectie. Verder is bij tulp en lelie een analyse uitgevoerd naar de aanwezige *Botrytis* resistentie in het bestaande assortiment.

- ***Voor zowel lelie als tulp is er een heel scala van resistentieniveau's waar te nemen. Bij lelie zijn vooral de Oriental lelies resistent tegen B. elliptica. Deze zijn weliswaar kruisbaar met Aziaten, maar introgressie is geen eenvoudige zaak.***

## Literatuur

- Adak, S. & Stuehr, D. J. (2001). A proximal tryptophan in NO synthase controls activity by a novel mechanism. *Journal of inorganic biochemistry* **83**, 301-308.
- Alderton, W. K., Cooper, C. E. & Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical journal* **357**, 593-615.
- Anto, R. J., Mukhopadhyay, A., Denning, K. & Aggarwal, B. B. (2002). Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl. *Carcinogenesis* **23**, 143-150.
- Audenaert, K., Pattery, T., Cornelis, P. & Hofte, M. (2002). Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: Role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Molecular plant microbe interactions* **15**, 1147-1156.
- Berna, A. & Bernier, F. (1999). Regulation by biotic and abiotic stress of a wheat germin gene encoding oxalate oxidase, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing enzyme. *Plant Molecular Biology. Feb* **39**, 539-549.
- Bernier, F. & Berna, A. (2001). Germins and germin-like proteins: Plant do-all proteins. But what do they do exactly? *Plant physiology and biochemistry* **39**, 545-554.
- Bigirimana, J. & Hofte, M. (2002). Induction of systemic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in bean by a benzothiadiazole derivative and rhizobacteria. *Phytoparasitica* **30**, 159-168.
- Cessna, S. G., Sears, V. E., Dickman, M. B. & Low, P. S. (2000). Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *Plant cell* **12**, 2191-2199.
- Chen, C. Y. & Huang, H. E. (1997). Salicylic acid-induced resistance of lily leaves against *Botrytis elliptica*. *Plant Pathology Bulletin* **6**, 76-82.
- Cohen, Y. (2001). The BABA story of induced resistance. *Phytoparasitica* **29**, 375-378.
- Costet, L., Dorey, S., Fritig, B. & Kauffmann, S. (2002). A pharmacological approach to test the diffusible signal activity of reactive oxygen intermediates in elicitor-treated tobacco leaves. *Plant and cell physiology* **43**, 91-98.
- Diaz, J., ten Have, A. & van Kan, J. A. L. (2002). The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant physiology* **129**, 1341-1351.
- Donaldson, P. A., Anderson, T., Lane, B. G., Davidson, A. L. & Simmonds, D. H. (2001). Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat gf-2.8 (germin) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiological and molecular plant pathology* **59**, 297-307.
- Druka, A., Kudrna, D., Kannangara, C. G., von Wettstein, D. & Kleinhofs, A. (2002). Physical and genetic mapping of barley (*Hordeum vulgare*) germin-like cDNAs. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **99**, 850-855.
- Garcia-Pineda, E. & Lozoya-Gloria, E. (1999). Induced gene expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC oxidase) in pepper (*Capsicum annuum* L.) by arachidonic acid. *Plant Science* **145**, 11-21.
- Gil-Ad, N. L., Bar Nun, N., Noy, T. & Mayer, A. M. (2000). Enzymes of *Botrytis cinerea* capable of breaking down hydrogen peroxide. *Fems microbiology letters* **190**, 121-126.
- Glazebrook, J., Chen, W. J., Estes, B., Chang, H. S., Nawrath, C., Métraux, J. P., Zhu, T. & Katagiri, F. (2003). Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant Journal* **34**, 217-228.

- Govrin, E. M. & Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current biology* **10**, 751-757.
- Govrin, E. M. & Levine, A. (2002). Infection of Arabidopsis with a necrotrophic pathogen, *Botrytis cinerea*, elicits various defense responses but does not induce systemic acquired resistance (SAR). *Plant molecular biology* **48**, 267-276.
- Hung, K. T., Chang, C. J. & Kao, C. H. (2002). Paraquat toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Journal of plant physiology* **159**, 159-166.
- Jakab, G., Cottier, V., Toquin, V., Rigoli, G., Zimmerli, L., Mettraux, J. P. & Mauch Mani, B. (2001).  $\beta$ -Aminobutyric acid-induced resistance in plants. *European journal of plant pathology* **107**, 29-37.
- Kim, M. K., Choi, G. J. & Lee, H. S. (2003). Fungicidal property of Curcuma longa L. rhizome-derived curcumin against phytopathogenic fungi in a greenhouse. *Journal of agricultural and food chemistry* **51**, 1578-1581.
- Kogel, K. H. & von Alten, H. (2001). Induced resistance. *Zeitschrift fur pflanzenkrankheiten und pflanzenschutz journal of plant diseases and protection* **108**, 643-652.
- Krahl, K. H. & Randle, W. M. (1999). Resistance of petunia phenotypes to *Botrytis cinerea*. *Hortscience* **34**, 690-692.
- Kulek, B. & Floryszak Wieczorek, J. (2002). Local and systemic protection of poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd.) against *Botrytis cinerea* Pers. induced by benzothiadiazole. *Acta physiologiae plantarum* **24**, 273-278.
- Lane, B. G. (2002). Oxalate, germins, and higher-plant pathogens. *Iubmb life* **53**, 67-75.
- Liechti, R. & Farmer, E. E. (2002). The jasmonate pathway. *Science* **296**, 1649-1650.
- Van Loon, L. C. (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European journal of plant pathology* **103**, 753-765.
- Manners, J. M., Penninckx, I., Vermaere, K., Kazan, K., Brown, R. L., Morgan, A., Maclean, D. J., Curtis, M. D., Cammue, B. P. A. & Broekaert, W. F. (1998). The promoter of the plant defensin gene PDF1.2 from Arabidopsis is systemically activated by fungal pathogens and responds to methyl jasmonate but not to salicylic acid. *Plant Molecular Biology. Dec* **38**, 1071-1080.
- Mercier, J., Roussel, D., Charles, M. T. & Arul, J. (2000). Systemic and local responses associated with UV- and pathogen-induced resistance to *Botrytis cinerea* in stored carrot. *Phytopathology* **90**, 981-986.
- Miquel, J., Bernd, A., Sempere, J. M., Diaz Alperi, J. & Ramirez, A. (2002). The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. *Archives of gerontology and geriatrics* **34**, 37-46.
- Muckenschnabel, I., Goodman, B. A., Williamson, B., Lyon, G. D. & Deighton, N. (2002). Infection of leaves of *Arabidopsis thaliana* by *Botrytis cinerea*: changes in ascorbic acid, free radicals and lipid peroxidation products. *Journal of experimental botany* **53**, 207-214.
- Muckenschnabel, I., Gronover, C. S., Deighton, N., Goodman, B. A., Lyon, G. D., Stewart, D. & Williamson, B. (2003). Oxidative effects in uninfected tissue in leaves of French bean (*Phaseolus vulgaris*) containing soft rots caused by *Botrytis cinerea*. *Journal of the science of food and agriculture* **83**, 507-514.
- Murphy, A. M., Holcombe, L. J. & Carr, J. P. (2000). Characteristics of salicylic acid-induced delay in disease caused by a necrotrophic fungal pathogen in tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **57**, 47-54.
- Patykowski, J. & Urbanek, H. (2003). Activity of enzymes related to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and metabolism in leaf apoplastic fraction of tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. *Journal of phytopathology phytopathologische zeitschrift* **151**, 153-161.

- Pieterse, C.M.J., & van Loon, L.C. (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science* **4**: 52-58.
- Pieterse, C. M. J., Van Pelt, J. A., Van Wees, S. C. M., Ton, J., Leon-Kloosterziel, K. M., Keurentjes, J. J. B., Verhagen, B. W. M., Knoester, M., Van der Sluis, I., Bakker, P. A. H. M. & Van Loon, L. C. (2001). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: Triggering, signalling and expression. *European Journal of Plant Pathology* **107**, 51-61.
- Prins, T. W., Tudzynski, P., Von Tiedemann, A., Tudzynski, B., Ten Have, A., Hansen, M. E., Tenberge, K. & Van Kan, J. A. L. (2000). Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. *Fungal Pathology*, 33-64.
- Que, L. G., George, S. E., Gotoh, T., Mori, M. & Huang, Y. C. T. (2002). Effects of arginase isoforms on NO production by nNOS. *Nitric oxide biology and chemistry* **6**, 1-8.
- Ramalingam, J., Cruz, C. M. V., Kukreja, K., Chittoor, J. M., Wu, J. L., Lee, S. W., Baraoidan, M., George, M. L., Cohen, M. B., Hulbert, S. H., Leach, J. E. & Leung, H. (2003). Candidate Defense genes from rice, barley, and maize and their association with qualitative and quantitative resistance in rice. *Molecular plant microbe interactions* **16**, 14-24.
- Rozhnova, N. A., Gerashchenkov, G. A., Odintsova, T. I., Musin, S. M. & Pukhal' skii, V. A. (2001). Protective effect of arachidonic acid during viral infection: Synthesis of new proteins by in vitro potato plants. *Russian journal of plant physiology* **48**, 780-787.
- Segarra, C. I., Casalongué, C. A., Pinedo, M. L., Ronchi, V. P. & Conde, R. D. (2003). A germin-like protein of wheat leaf apoplast inhibits serine proteases. *Journal of experimental botany* **54**, 1335-1341.
- Simmonds, J., Cass, L., Routly, E., Hubbard, K., Donaldson, P., Bancroft, B., Davidson, A., Hubbard, S. & Simmonds, D. (2004). Oxalate oxidase: a novel reporter gene for monocot and dicot transformations. *Molecular breeding* **13**, 79-91.
- Staswick, P. E. & Lehman, C. C. (1999). Jasmonic acid-signaled responses in plants. In *Induced plant defenses against pathogens and herbivores*, pp. 117-136.
- Suo, Y. & Leung, D. W. N. (2001). Induction of resistance to *Diplocarpon rosae* and *Agrobacterium tumefaciens* by acibenzolar-S-methyl (BTH) in rose. *Zeitschrift für pflanzenkrankheiten und pflanzenschutz journal of plant diseases and protection* **108**, 382-391.
- Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Penninckx, L. A. M. A., Mauch Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P. A. & Broekaert, W. F. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 15107-15111.
- von Tiedemann, A. (1997). Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*. *Physiological and molecular plant pathology* **50**, 151-166.
- Ton, J. & Mauch Mani, B. (2004).  $\beta$ -amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant journal* **38**, 119-130.
- Ton, J., Van Pelt, J. A., Van Loon, L. C. & Pieterse, C. M. J. (2002). Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Molecular plant microbe interactions* **15**, 27-34.
- Vuletic, M. & Šukalovic, V. H. T. (2000). Characterization of cell wall oxalate oxidase from maize roots. *Plant Science* **157**, 257-263.
- van Wees, S. C. M., de Swart, E. A. M., van Pelt, J. A., van Loon, L. C. & Pieterse, C. M. J. (2000). Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of



- salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8711-8716.
- Woo, E. J., Dunwell, J. M., Goodenough, P. W., Marvier, A. C. & Pickersgill, R. W. (2000). Germin is a manganese containing homohexamer with oxalate oxidase and superoxide dismutase activities. *Nature Structural Biology* **7**, 1036-1040.
- Zhou, F. S., Zhang, Z. G., Gregersen, P. L., Mikkelsen, J. D., de Neergaard, E., Collinge, D. B. & Thordal-Christensen, H. (1998). Molecular characterization of the oxalate oxidase involved in the response of barley to the powdery mildew fungus. *Plant Physiology* **117**, 33-41.
- Zimmerli, L., Mettraux, J. P. & Mauch Mani, B. (2001).  $\beta$ -aminobutyric acid-induced protection of *Arabidopsis* against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* **126**, 517-523.