



Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2010 – 2011

Pathologische en microscopische studie van meeldauw
op zijn 'nieuwe' gastheer triticale

Adriaan Vanheule

Promotor: Prof. dr. ir. Monica Höfte

Co-promotor: Prof. dr. ir. Geert Haesaert

Tutor: Veronique Troch

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master in de bio-ingenieurswetenschappen: landbouwkunde

Auteursrecht

De auteur en de promotor(en) geven de toelating deze scriptie voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik.

Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze scriptie.

Gent, juni 2011

Adriaan Vanheule
Auteur

Prof. dr. ir. Monica Höfte
Promotor

Prof. dr. ir. Geert Haesaert
Co-promotor

Woord vooraf

Eerst en vooral wil ik mijn tutor Veronique Troch van harte bedanken voor de zeer goede samenwerking. Gedurende het ganse jaar stond zij elke dag paraat om mij bij te staan in deze thesis, en van haar leerde ik alle technieken en de correcte onderzoeksmethodiek om onderzoek als dit uit te voeren. Ook bij het praktisch werk van de virulentietesten was zij een onmiskenbare hulp. Daarnaast wil ik ook mijn promotor prof. dr. ir. Monica Höfte en co-promotor prof. dr. ir. Geert Haesaert bedanken voor de ondersteuning en goede opvolging van de thesis.

Het individueel scoren van 12 000 conidia, het is een tijdsrovend werk. De vele uren aan de microscoop zal ik niet gauw vergeten. In dit opzicht gaat mijn dank ook uit naar dr. ir. Kris Audenaert en Boris Bekaert voor hun respectievelijke hulp bij het verwerken van de data en het uitvoeren van de (nachtelijke) kleuringen uit het microscopisch onderzoek.

Een thesis is het sluitstuk van een academische opleiding en die zou ik nooit succesvol beëindigd kunnen hebben zonder de steun van mijn ouders en vrienden. Hen bedanken is hier dus ook zeker op zijn plaats. Hierbij denk ik vooral aan mijn ouders, van wie ik nu al 22 jaar alle kansen en mogelijkheden krijg die ik maar kan wensen.

Inhoudsopgave

Lijst van afkortingen	1
Samenvatting.....	2
Summary	3
1 Inleiding	4
2 Literatuurstudie.....	6
2.1 Triticale.....	6
2.1.1 Ontstaan en eigenschappen.....	6
2.1.2 Productie en opbrengst.....	6
2.1.3 Meeldauw op triticale	7
2.2 <i>Blumeria graminis</i>	7
2.2.1 Symptomen	7
2.2.2 Taxonomie en levenscyclus	7
2.2.3 Intraspecifieke taxonomie: formae speciales.....	8
2.3 Resistentie tegen meeldauw: macroscopisch	9
2.3.1 Rasspecifieke en partiële resistentie.....	9
2.3.2 <i>Pm</i> genen in tarwe.....	10
2.3.3 Postuleren van resistentiegenen.....	13
2.4 Resistentie tegen meeldauw: microscopisch	14
2.4.1 Infectieproces	14
2.4.2 Verdedigingsmechanismen van de plant	16
3 Materiaal en methoden	23
3.1 <i>Blumeria graminis</i>	23
3.2 Virulentietesten.....	24
3.2.1 Plantmateriaal	24
3.2.2 Inoculatie.....	24
3.2.3 Data analyse	25
3.3 Postulatie van resistentiegenen in triticale.....	26
3.4 Microscopisch onderzoek.....	26
3.4.1 Inoculatie.....	26
3.4.2 Cytologische kleuringen	26
3.4.3 Data analyse	27
4 Resultaten.....	28
4.1 Virulentietesten.....	28

4.1.1	Virulentiefrequenties	30
4.1.2	Virulentiebomen.....	30
4.2	Postulatie van resistentiegenen in triticale.....	31
4.3	Microscopisch onderzoek.....	32
4.3.1	Ontwikkeling van meeldauw	32
4.3.2	Histochemische kleuring van H ₂ O ₂	35
4.3.3	Histochemische kleuring van fenolische componenten.....	38
4.3.4	Histochemische kleuring van callose.....	40
5	Discussie	43
5.1	Virulentietesten.....	43
5.1.1	Virulentietesten en virulentiebomen	43
5.1.2	Virulentiefrequenties	44
5.2	Postulatie van <i>Pm</i> genen in triticale.....	45
5.3	Microscopisch onderzoek.....	45
5.3.1	Ontwikkeling van meeldauw	45
5.3.2	Non-host verdedigingsmechanismen van de plant.....	46
5.3.3	Hypersensitieve respons	48
6	Conclusie	49
	Referenties	50

Lijst van afkortingen

AGT	Appressoriale kiembuis ('Appressorial germination tube')
avr	Avirulentie factor
<i>B. g. f. sp. hordei</i>	<i>Blumeria graminis forma specialis hordei</i>
<i>B. g. f. sp. tritici</i>	<i>Blumeria graminis forma specialis tritici</i>
<i>B. g. f. sp. triticales</i>	<i>Blumeria graminis</i> op triticales
CWA	Celwand afzetting ('Cell wall apposition')
DAB	3,3-diaminobenzidine
ECM	Extracellulaire matrix
ETI	Effector geactiveerde immuniteit ('Effector triggered immunity')
hai	Uur na inoculatie
HR	Hypersensitieve respons
IGS	Intergenic spacer
MAMP	Microbieel geassocieerde moleculaire patronen ('Microbial-associated molecular pattern')
MAPK	Mitogeen geactiveerde proteïne kinase ('Mitogen-activated protein cascade')
<i>Mlx</i>	Meeldauw locus x
NB-LRR	Nucleotide-bindingsplaats met C-terminaal domein met leucine-rijke herhalingen
PAMP	Pathogen geassocieerde moleculaire patronen ('Pathogen-associated molecular pattern')
PGT	Primaire kiembuis ('Primary germination tube')
<i>Pmx</i>	Meeldauw resistentiegen x (Powdery mildew resistance gene x)
PR proteïne	Pathogeen gerelateerde eiwitten ('Pathogenesis-related')
PRR	Patroon-herkenningsreceptor ('Pattern recognition receptor')
PTI	PAMP geactiveerde immuniteit ('PAMP-triggered immunity')
ROS	Reactieve zuurstofdeeltjes ('Reactive oxygen species')
SA	Salicylzuur ('Salicylic acid')
SAR	Systemisch verworven resistentie ('Systemic acquired resistance')

Samenvatting

De obligate schimmel *Blumeria graminis* veroorzaakt echte meeldauw of witziekte op graangewassen. Sinds 2001 slaagt *Blumeria graminis* er in triticale te infecteren en opbrengstverliezen te veroorzaken, terwijl de plant voordien volledig resistent was tegen meeldauw. In dit onderzoek wordt de hypothese gestaafd dat isolaten die infecties veroorzaken op triticale zijn ontstaan door gastheer-expansie van *Blumeria graminis forma specialis tritici*, de gespecialiseerde infectievorm van *B. graminis* op tarwe. Uit de virulentietesten op tarwe en triticale bleek dat de *triticales* isolaten in staat zijn zowel tarwe als triticale te infecteren, terwijl de *f. sp. tritici* isolaten nog steeds beperkt zijn tot hun specifieke gastheer tarwe. Wanneer ook het adaptatievermogen van *f. sp. tritici* in rekening gebracht wordt, lijkt een gastheer-expansie de meest waarschijnlijke verklaring voor de overwonnen resistentie van triticale.

Rasspecifieke resistentie van tarwe en triticale tegenover meeldauw wordt geregeld door *Pm* resistentiegenen. Enkele genen werden gevonden die nog steeds volledige resistentie tegenover de *triticales* isolaten verschaffen, zoals *Pm3b*, *Pm4b* en de combinaties *Pm1+Pm2+Pm9+Pm12* en *Mld+Pm2*. De doorbroken resistentie van veel *Pm* genen kan verklaard worden door het veelvuldig gebruik van deze genen in commerciële tarwecultivars over de laatste decennia.

Grondig inzicht in de doorbroken resistentie van triticale wordt belemmerd door de zeer beperkte kennis over de mogelijke aanwezigheid van *Pm* genen in de commerciële triticale cultivars. Met de resultaten van de pathogeniciteitstesten werden de *Pm6* en *Pm8* gepostuleerd als mogelijke resistentiegenen aanwezig in de onderzochte triticale cultivars. Dit toont de nauwe genetische variabiliteit van de huidige triticales aan.

Door middel van microscopisch onderzoek werd voor het eerst het infectieproces van de nieuwe *triticales* isolaten onderzocht. Histochemische kleuringen werden uitgevoerd om de ontwikkeling van meeldauw, de aanleg van papillae, en de accumulatie van H₂O₂ en fenolische componenten te volgen. Er werd vastgesteld dat het *triticales* isolaat dezelfde defensiemechanismen van de plant moest overwinnen als het *f. sp. tritici* isolaat en daar zelfs vlugger in slaagde, en bijgevolg vlugger infectie en kolonisatie bewerkstelligde. Het *f. sp. tritici* isolaat op triticale lokte efficiënte niet-waard resistentie uit, terwijl het *triticales* isolaat op tarwe deze overwon en wellicht later in de ontwikkeling met post-haustoriale resistentie te maken krijgt.

Er kan besloten worden dat bijkomende virulentietesten met een groter aantal isolaten, die meer representatief zijn voor de ganse populatie *B. graminis*, zullen leiden tot nog duidelijkere conclusies omtrent de waarschijnlijke gastheer-expansie. Er lijkt nog een toekomst te zijn voor de veredeling met rasspecifieke resistentie, en vooral gencombinaties met eventueel nieuwe *Pm* genen uit species verwant aan *T. aestivum* kunnen hier nuttig zijn. De gastheer-expansie liet de nieuwe *Blumeria graminis* isolaten niet enkel toe om triticale te infecteren, maar ook verloopt hun infectieproces sneller. Uitgebreider microscopisch onderzoek en histochemische kleuringen op verschillende *triticales* isolaten en tijdstippen zullen ook deze vaststelling verder kunnen ontrafelen.

Summary

The obligate fungus *Blumeria graminis* causes powdery mildew on cereal crops. Since 2001, *Blumeria graminis* has been able to infect triticale and cause yield loss, while the plant was resistant against powdery mildew before. This research supports the hypothesis that a host-range expansion has occurred from the *forma specialis tritici* of *Blumeria graminis* (the specialized infection form on wheat) to the new host triticale. From the virulence testing it was learnt that the new *triticales* isolates are able to infect both wheat and triticale, while the *f. sp. tritici* isolates can only infect wheat. *F. sp. tritici* is also known to have a large adaptive capability. When these factors are taken into account, it seems that host-range expansion is the most likely explanation for the breakthrough of resistance in triticale.

Race specific resistance against powdery mildew in wheat and triticale is regulated by *Pm* resistance genes. In this research, some genes were found that still provide full resistance against the *triticales* isolates, such as *Pm3b*, *Pm4b* and the combinations *Pm1+Pm2+Pm9+Pm12* and *Mld+Pm2*. The overcome resistance regulated by many *Pm* genes can be explained by the frequent usage of these genes in the commercial wheat cultivars during the last decennia.

A thorough understanding of the overcome resistance in triticale is hindered by the very limited knowledge of which *Pm* genes are present in the commercial triticale cultivars. With the results of the virulence tests, the resistance genes *Pm6* and *Pm8* were postulated as possible genes present in the tested triticale cultivars. This also illustrates the narrow genetic variability of the current triticale cultivars.

Through microscopic research, the infection process of the *triticales* isolates was studied for the first time. Histochemical colorings were performed to follow the development of the fungus, the deposition of papillae, and the accumulation of H₂O₂ and phenolic compounds. It was shown that the *triticales* isolates need to conquer the same defense responses from the plant as the *f. sp. tritici* isolates and even succeeded in this faster. Therefore the *triticales* isolates also performed infection and colonization faster. The *f. sp. tritici* isolate on triticale encountered successful non-host resistance, while the *triticales* isolate on wheat conquered this resistance and is likely halted by post-haustorial defense later in its development.

It can be concluded that additional virulence testing with a larger number of isolates, which would be more representative of the entire *B. graminis* population, will lead to clearer conclusions regarding the likely host-range expansion. There seems to be a future left for plant breeding with race specific resistance, especially using gene combinations with additional *Pm* genes found in species related to *T. aestivum*. Host-range expansion has not only allowed *Blumeria graminis* isolates to infect triticale, but their infection speed seems to have risen too. Additional microscopic research and histochemical colorings on different *triticales* isolates and points of time will further unravel this notion.

1 Inleiding

Triticale (\times *Triticosecale*) is een relatief 'nieuw' graangewas dat sinds 1980 commercieel wordt geteeld in Europa. Het komt voort uit een intergenerische kruising van tarwe (geslacht *Triticum*) en rogge (geslacht *Secale*). Hierdoor combineert triticale de goede eigenschappen van de twee genetische ouders, namelijk de ziektebestendigheid van rogge en de hoge productiewaarde van tarwe (Mergoum & Gomez-Macpherson, 2004).

Recent werd opgemerkt dat *Blumeria graminis*, de schimmel die echte meeldauw veroorzaakt op tal van gewassen, nu ook triticale kan infecteren en aldus opbrengstverliezen kan veroorzaken. Deze kunnen oplopen tot 25% van de normale productie (Domeradzka en Czembor, 2009). *B. graminis* is een obligate biotrofe schimmel die leeft ten koste van levende plantencellen. Daardoor heeft *B. graminis* zich naargelang de waardplant gespecialiseerd in 8 verschillende *formae speciales*, en infectie van een bepaalde waardplant(groep) door een andere f. sp. is niet mogelijk (Walker et al., 2011).

Deze nieuwe gevoeligheid van triticale cultivars voor meeldauw werd voor het eerst vastgesteld in Zwitserland en Frankrijk in 2001 (Mascher et al., 2008; Walker et al., 2009). Tussen 2002 en 2005 stelde men ook in Polen vast dat de veel gebruikte variëteit Lamberto gevoelig was geworden aan meeldauw (Strzembicka et al., 2006; Domeradzka et al., 2009).

Haesaert et al. (2006) volgden het voorkomen van verschillende ziekten op triticale in België sinds de introductie ervan op grote schaal in de eerste helft van de jaren '80. Gedurende 21 jaar werden over heel Vlaanderen proeven gedaan op verschillende triticale variëteiten. Meeldauw werd voor het eerst opgemerkt in het groeiseizoen 1999-2000, kwam systematisch meer voor en tegen 2005 was meer dan 80% van de triticale variëteiten zeer gevoelig aan de ziekte. Andere bladziekten zoals bruine roest kwamen in bepaalde groeiseizoenen ook voor, maar voor meeldauw werd een duidelijke verhoogde aanwezigheid vastgesteld. Men concludeerde dat de meeste triticale variëteiten nu méér gevoelig zijn aan meeldauw dan de meeste wintertarwe variëteiten. Globaal stelde men vanaf 2003 over heel Europa het probleem vast en dit over verscheidene triticale variëteiten.

Het gebruik van resistente triticale variëteiten is een efficiënte en economisch interessante manier om de verliezen te beperken, en vanuit een ecologisch standpunt wordt dit verkozen boven fungicide behandelingen, die door de recente opkomst van meeldauw nu regelmatig nodig zijn (Bennett, 1984).

De onderzoeksvraag werd gesteld hoe het kan dat *B. graminis* na zoveel jaren wel triticale kan infecteren. Genetisch onderzoek en virulentiespectra wezen in de richting van een evolutie uit de *forma specialis* van meeldauw die tarwe infecteert (f. sp. *tritici*) (Walker et al., 2011). Lopende onderzoeken proberen nu vooral bronnen voor hernieuwde resistentie te vinden (Walker et al., 2009).

De plant-schimmel interactie tussen graangewassen en meeldauw wordt bepaald door specifieke resistentiegenen in de plant (*Pm* genen) en overeenkomstige avirulentie factoren in de schimmel (*Avr* genen). De nieuwe isolaten infecteren rogge niet waardoor de resistentiegenen hierin aanwezig een interessant toekomstperspectief bieden. Ook niet alle tarwecultivars worden evenveel aangetast: doorgedreven onderzoek van virulentiespectra, aangevuld met gericht genetisch

onderzoek zal hier in de toekomst uitwijzen welke genen nog nuttig zijn. Ook kunnen op deze manier de triticale cultivars gedefinieerd worden die hun resistentie behouden hebben.

De thesis bestaat uit twee luiken. Het eerste luik wil aan de hand van pathogeniciteitstesten een beeld geven van het infectiepatroon van de nieuwe vorm van *B. graminis*. Dit gebeurt door virulentietesten uit te voeren op tarwe cultivars met gekende resistentiegenen. Vervolgens kan een hypothese voorgesteld worden over de aanwezige resistentiegenen in de triticale cultivars, hetgeen tot nog toe onbekend is. Finaal kan door het identificeren van triticale cultivars waarvan de resistentie nog niet doorbroken is, een mogelijke bron van resistentie gevonden worden voor nieuwe kruisingen. Ook in rogge en tarwe kunnen dergelijke bronnen gevonden worden door het identificeren van cultivars die niet geïnfecteerd worden door de nieuwe isolaten afkomstig van triticale.

Een tweede luik focust op de microscopische studie van de interactie tussen de verschillende *formae speciales* van *B. graminis* en hun verschillende waardplanten. In vorige onderzoeken werd gesteld dat de *Blumeria graminis* vorm die triticale infecteert, wellicht geëvolueerd is uit *f. sp. tritici* (Walker et al., 2011). Tijdens de microscopische studie zullen mogelijke verschillen in infectiemechanisme tussen de triticale isolaten en *f. sp. tritici* bij zowel compatibele als incompatibele interacties in kaart worden gebracht. Ook de mogelijke afweermechanismen van triticale tegen *B. graminis* zullen verduidelijkt worden. Conclusies over deze verschillen geven dan de mogelijkheid tot meer gericht genetisch onderzoek.

Een tijdsreeks wordt opgesteld om op verschillende tijdstippen na inoculatie de interactie tussen schimmel en plant op te volgen. Verscheidene cytologische kleuringen worden uitgevoerd om mogelijke verdedigingsmechanismen van de plant in de loop van het infectieproces in kaart te brengen. Door dit te doen voor zowel compatibele als incompatibele interacties op tarwe en triticale kunnen er mogelijke verschillen bij infectie vastgesteld worden.

2 Literatuurstudie

2.1 Triticale

2.1.1 Ontstaan en eigenschappen

Triticale (*X Triticosecale* Wittmack) is een vrij 'jong' gewas dat als genetische ouders tarwe en rogge heeft, en beide genomen stabiel combineert. Het werd gekruist om de goede eigenschappen van tarwe en rogge te combineren. Rogge staat bekend voor zijn koude- en ziekte-tolerantie en zijn aanpassingsvermogen aan verschillende bodems en klimaten, terwijl tarwe hoogproductief is en toepassingen heeft in vele en diverse voedingsproducten. Triticale is in staat de productiewaarden van tarwe te evenaren en bij minder goede groeiomstandigheden kan ze deze zelfs overtreffen. In koude klimaten zoals in Polen, en droge omstandigheden zoals in Noord-Afrika, is triticale een volwaardig alternatief voor tarwe en presteert het zelfs beter. Haar hoge tolerantie tegenover ziekten krijgt ze van rogge (Ammar et al., 2004). Slechts recent komen problemen op met echte meeldauw die de duurzame resistentie van triticale blijkbaar doorbroken heeft.

Triticale is een intergenerische hybride tussen tarwe en rogge. Succesvolle kruising tussen twee gewassen uit verschillende genera (hier *Triticum* en *Secale*) is uitzonderlijk. Tarwe is in dit geval ofwel *Triticum aestivum* (gewone tarwe), dat hexaploïd (AABBDD) is, of *Triticum durum* (harde tarwe), dat tetraploïd (AABB) is. Rogge (*Secale*) is diploïd (RR). Deze kruisingen geven aanleiding tot respectievelijk een octoploïde (AABBDDRR) of een hexaploïde (AABBRR) triticale. Hexaploïde triticale werd in de laatste decennia meest intensief bestudeerd en geteeld.

De eerste kruisingen tussen tarwe en rogge werden beschreven op het eind van de 19^e eeuw. De eerste hexaploïde kruisingen dateren van de eerste decennia van de 20^e eeuw. Het gebruik van 'embryo rescue' op artificiële media, en van colchicine voor chromosoom verdubbelingen waren essentieel voor het creëren van voldoende genetische variatie binnen het nieuwe gewassen. Deze primaire triticales werden onderling gekruist en vooral de kruising tussen de hexaploïde en octoploïde vorm gaf aanleiding tot superieure secundaire hexaploïde variëteiten. In 1968 werd het eerste triticale ras gecommercialiseerd (Ammar et al., 2004).

Het 'International Maize and Wheat Improvement Center' (CIMMYT) speelde een zeer belangrijke rol in het optimaliseren en verspreiden van commerciële triticale cultivars. Tussen 1975 en 2000 brachten ze 146 cultivars in 23 verschillende landen op de markt. Onderzoek dat zich vooral in Polen situeerde, leidde eveneens tot de wijde verspreiding van wintercultivars, vooral in Noord-Europa (Mergoum et al., 2004).

2.1.2 Productie en opbrengst

Triticale werd commercieel belangrijk vanaf de jaren '80. Sedertdien steeg wereldwijd de triticale productie jaarlijks met 18%, terwijl andere graangewassen een afname in hun productie zagen. Deze stijging is te danken aan het groeiende areaal van triticale, maar ook de hogere opbrengst per hectare speelt hierbij een rol. België had in 2002 de tweede hoogste opbrengst per hectare, namelijk 6,3 ton / ha (Salmon et al., 2004).

De meest recente gegevens die de Voedsel- en Landbouworganisatie van de Verenigde naties (FAO) ter beschikking stelt, documenteren de productie in 2009. In België werd 6200 ha triticale geteeld en een opbrengst van 45100 ton gerealiseerd. Dit vertaalt zich in een opbrengst per hectare van

ongeveer 7,3 ton, de hoogste in de wereld. In Polen wordt met bijna 1.500.000 ha het grootste triticale areaal opgemeten, ongeveer 35%. In de hele wereld wordt ongeveer 4.150.000 ha triticale geteeld met een totale productie van 15.000.000 ton.

2.1.3 Meeldauw op triticale

Sinds 2001 werd in tal van landen opgemerkt dat *Blumeria graminis* er in slaagt triticale te infecteren, terwijl ze voordien resistent was tegen deze ziekte (Haesaert et al., 2006; Mascher et al., 2008; Walker et al., 2009). Net als bij andere graangewassen worden ook bij deze interactie serieuze opbrengstverliezen vastgesteld (Domeradzaka en Czembor, 2009).

Door doorgedreven veredeling kan de genetische variatie aanwezig in triticale sterk verminderd zijn. Tegelijkertijd blijft het productie areaal van triticale alsmaar stijgen waardoor meer pathogenen de kans krijgen nieuwe infectievormen te ontwikkelen die triticale wel kunnen aantasten. Dit is nu blijkbaar het geval bij meeldauw, waar volgens Walker et al. (2011) *B. graminis f.sp. tritici* is geëvolueerd en daardoor in staat is triticale te infecteren. Het genoom van triticale ontrafelen en het identificeren van de aanwezige resistentiegenen is in dit opzicht belangrijk. Het is helaas vaak niet meer duidelijk wat de precieze voorouders van de moderne triticale cultivars zijn. Deze informatie wordt door kwekers beschermd, in zoverre ze al gekend is. Daarnaast werd bij het veredelen van de moderne triticale cultivars volgens Walker et al. (2011) weinig aandacht besteed aan behoud van resistentiegenen, wat toen niet als een belangrijk criterium werd beschouwd.

2.2 *Blumeria graminis*

2.2.1 Symptomen

Meeldauw is te herkennen aan het wit/grijs mycelium op het bladoppervlak van de geïnfecteerde plant – vandaar ook de naam ‘witziekte’. Later in het groeiseizoen kunnen donkerbruine/zwarte vruchtlichamen ontstaan.

Meeldauw gedijt vooral goed in streken met een gematigd klimaat. Wanneer tarwe vroeg in de ontwikkeling wordt aangetast, gaat dit ten koste van de gewasdictheid en is er minder uitstoeeling. Latere infectie zal vooral de zaadproductie in gedrang brengen doordat er minder korrels per aar gevormd worden en de gevormde zaden lichter zijn. De fotosynthetische capaciteit van de bladeren vermindert en ook nutriënten en vocht die door de schimmel worden opgenomen, zijn niet meer voor de plant beschikbaar. Dit kan opbrengstverliezen veroorzaken van 25 tot zelfs 40%.

2.2.2 Taxonomie en levenscyclus

De familie van de *Erysiphaceae* (orde *Erysiphales*) omvat alle genera die echte meeldauw veroorzaken op bijna 10.000 verschillende species, waaronder ook economisch belangrijke zoals aardbeien, druiven, tomaten en graangewassen.

Blumeria graminis is het enige species in het genus *Blumeria*, en infecteert verschillende planten binnen de *Poaceae* of grassenfamilie. Vroeger werd de schimmel *Erysiphe graminis* genoemd. Speer (1973) stelde als eerste dat *Blumeria* morfologisch verschillend is van het genus *Erysiphe*, wat sedertdien ook genetisch bewezen is. Conidia afkomstig van deze schimmel vormen ook als enige een primaire kiembuis (PGT; zie verder). *B. graminis* wordt ook nog intraspecifiek opgedeeld in *formae speciales*, hierover volgt verder meer.

Een uitstekende 'review' over meeldauw werd door Glawe (2008) geschreven, hier volgen enkele relevante gegevens. Meeldauw is een schimmel behorende tot de Ascomycota, en heeft hierdoor zowel een anamorfe als een teleomorfe vorm. Het is een obligate parasiet en een epifyt wat wil zeggen dat het zich ontwikkelt aan de buitenzijde van het blad. Tevens is het een obligaat biotrofe schimmel en doodt het dus het geïnfecteerde plantweefsel niet af maar worden complexe interactie structuren gevormd, namelijk de haustoria.

Twee vormen van voortplanting bestaan. De geslachtelijke vorm omvat de productie van ascosporen, die de overwinteringvorm van de schimmel zijn. Deze wordt ook de teleomorfe vorm genoemd. *B. graminis* is heterothallic, dit betekent dat voor seksuele voortplanting zowel een 'mannelijk' als een 'vrouwelijk' organisme noodzakelijk zijn. Door fusie van de tippen van de twee hyfen (een vrouwelijk ascogonium en een mannelijk antheridium) ontstaat een dikaryotische cel. Later versmelten ook de kernen en ontwikkelt het fusieproduct zich in een vruchtlichaam of ascocarp. Hierin zitten dan acht ascosporen. Bij *Blumeria graminis* zijn deze vruchtlichamen volledig gesloten en worden ze cleistothecia genoemd.

De anamorfe of asexuele vorm van de schimmel die in het groeiseizoen standaard voorkomt, zijn de conidia. Belanden de conidia op een gevoelige waardplant (compatibele reactie) dan ontwikkelt zich na geslaagde penetratie een gelobd haustorium in de epidermale plantencellen. Haustoria zijn gemodificeerde hyfen en hebben elk een kern. Op het bladoppervlak ontwikkelt zich het mycelium, dat een wit poederachtig uitzicht heeft. De haustoria worden gescheiden van het mycelium door een septum met een porie. Op het mycelium ontwikkelen zich conidioforen die vanaf enkele dagen na infectie kettingen van ongeveer 8 ééncellige ellipsvormige conidia dragen (Wyand, 2001). Ze staan min of meer loodrecht op het bladoppervlak. Conidia van echte meeldauw bevatten vrij veel water, dit verklaart waarom de schimmel ook in droge omstandigheden kan kiemen. Na transport, veelal door wind, kan de infectiecyclus opnieuw starten. Een hoge relatieve vochtigheid kan dit proces negatief beïnvloeden.

Graangewassen in Europa hebben in vele gevallen zomer- en wintertypes, die beiden gastheer kunnen zijn voor *B. graminis*. Er zijn echter ook momenten waarop voor de schimmel geen levende waardplanten aanwezig zijn. Lage temperaturen in de winter en afwezigheid van levend, groen plantmateriaal in de late zomer verhinderen voortzetting van de asexuele cycli. Dan vormt de schimmel tijdens een seksuele cyclus ascosporen die dienen als overwinteringsstructuur, en later het inoculum zullen vormen voor nieuwe generaties van de schimmel.

2.2.3 Intraspecifieke taxonomie: formae speciales

Blumeria graminis heeft verschillende mogelijke waardplanten binnen de *Poaceae*. Voor elke waardplant heeft de schimmel een *forma specialis* (f. sp.) gedifferentieerd en deze f. sp. kan enkel zijn respectievelijke genus infecteren. Vier formae speciales werden beschreven voor wilde grassen en vier die infecteren op in cultuur gebrachte grassen. Deze zijn *tritici* op tarwe, *hordei* op gerst, *avenae* op haver en *secalis* op rogge. Deze specialisatie kan een onderdeel zijn van de co-evolutie van de formae speciales en deze graangewassen, wat wordt gestaafd door recent onderzoek van Oberhaensli et al. (2011).

Deze nauwe virulentie van de formae speciales zou echter niet overal even strikt zijn, en geografische verschillen zouden ook een rol spelen. Wyand (2001) stelde dat isolaten verzameld uit Israël op dit vlak een grotere diversiteit vertoonden.

Olesen et al. (2003) onderzochten de reactie van gerst, tarwe en haver op infectiepogingen door een niet-aangepaste f. sp. In vrijwel geen van de gevallen volgde succesvolle vorming van haustoria. Penetratie werd gestopt door vorming van papillae of celdood van de epidermale cel. Het is niet geweten of deze celdood dezelfde pathway volgt als de hypersensitieve respons in geval van rasspecifieke incompatibiliteit.

Genetisch onderzoek van de *B. graminis* populatie bewees het bestaan van verschillende moleculaire groepen die nauw overeenkomen met de *formae speciales* (Wyand en Brown, 2003). *B. graminis* f. sp. *tritici* en f. sp. *secalis* zijn genetisch het meest verwant. Net omdat triticale gekruist is uit tarwe en rogge, vermoedde men enige verwantschap tussen de nieuwe infectievorm op triticale, en deze twee *formae speciales*. Walker et al. (2011) beschouwden twee hypothesen, waarbij ofwel een hybridisatie was opgetreden tussen de twee *formae speciales*, ofwel één van de twee was geëvolueerd en zo de resistentie van triticale had doorbroken.

Hun onderzoek wees erop dat de tweede hypothese wellicht de juiste is. Ze verzamelden isolaten van meeldauw op tarwe, gerst, rogge, haver en triticale. Aan de hand van verschillende genetische merkers probeerden ze deze isolaten te clusteren. Op basis van de meeste merkers clusterden de triticale isolaten samen met deze van tarwe en rogge, terwijl de 'intergenic spacer (IGS) gene' de doorslag gaf voor het groeperen van de tarwe en triticale isolaten, duidelijk gedifferentieerd van deze op rogge.

Ze voerden ook pathogeniciteitstesten uit. De triticale isolaten infecteerden nooit haver en gerst, maar occasioneel wel rogge. Tarwe werd wel vaak geïnfecteerd wat geloofwaardigheid verleent aan de hypothese dat de isolaten geëvolueerde f. sp. *tritici* zijn.

2.3 Resistentie tegen meeldauw: macroscopisch

2.3.1 Rasspecifieke en partiële resistentie

Planten komen op elk moment in contact met talloze micro-organismen en ze hanteren een niet gastheerspecifieke ('non-host') resistentie om deze buiten te houden. Eenmaal *B. graminis* deze heeft overwonnen, zal de plant *Pm* genen activeren om zich te verdedigen tegen de pathogeen. Dit zijn genen die specifiek tegen meeldauw werken. Ze kunnen coderen voor rasspecifieke en partiële resistentie. De meeste *Pm* genen die we kennen coderen voor de eerste vorm. De resistentiegenen bij tarwe noemt men 'powdery mildew x' (*Pmx*) terwijl voor gerst 'mildew locus x' (*mlx*) wordt gebruikt.

Rasspecifieke resistentie steunt op de aanwezigheid van specifieke resistentiegenen (*R* genen) in tarwe. Dit zijn (semi)dominante genen die na transcriptie vaak tot de hypersensitieve respons (HR) leiden (Freialdenhoven et al., 1994). Ze worden enkel geactiveerd als er zich in de pathogeen een complementair *avr* gen bevindt. De producten van deze beide genen interageren direct of indirect waarna via een nog niet helemaal doorgronde signaaltransductie verdediging optreedt. Dit concept van noodzakelijke complementariteit wordt het 'gen-om-gen concept' genoemd en werd door Flor (1955) beschreven. Het gen-om-gen concept en alle *Pm* genen die hierop van toepassing zijn, worden verder besproken. Rasspecifieke resistentie noemt men ook kwalitatieve resistentie.

Partiële resistentie of kwantitatieve resistentie is niet rasspecifiek, dit wil zeggen dat de aanwezigheid van een specifieke effector niet noodzakelijk is. Niet één 'major' gen speelt hier een

rol, maar vele 'minor' genen waarvan men de effecten als additief beschouwt. Lillemo et al. (2008) vonden echter ook twee *Pm* loci die codeerden voor dit soort resistentie. Ze wordt ook basale resistentie genoemd. Ze is vooral uitgesproken in het volwassen stadium van de plant en laat compatibele interactie en dus infectie toe, maar vertraagt kolonisatie en groei van de pathogeen. Ook sporulatie wordt verminderd (Bennett, 1984).

2.3.2 *Pm* genen in tarwe

2.3.2.1 Oorsprong van rasspecifieke *Pm* genen

Verschillende auteurs hebben in de afgelopen jaren de ontwikkelingen op vlak van *Pm* genen uitstekend samengevat. Sinds de besprekingen van onder andere Bennett (1984), Hsam en Zeller (2002) en Huang en Röder (2004) zijn er wel verscheidene bijkomende allelen gevonden. Tot nu toe zijn resistentiegenen op in totaal 43 verschillende loci gevonden (*Pm1* – *Pm43*), de recentste door He et al. (2009). Twee daarvan (*Pm38* en *Pm39*) coderen echter niet voor rasspecifieke resistentie, andere coderen voor zowel rasspecifieke als partiële resistentie zoals verder besproken.

Een overzicht van de gekende en voor deze thesis relevante *Pm* genen wordt in tabel 1 gegeven. Dit zijn de *Pm* genen die het meest gebruikt worden in de Noord-Europese tarwe-veredeling (Hsam en Zeller, 2002). Tevens is de chromosoomlocatie en oorsprong binnen de *Triticeae* in de tabel te vinden. De meest gecultiveerde variant van tarwe (*T. aestivum*) combineert drie genomen, die afkomstig zijn van verschillende voorouders binnen de *Triticeae* (A, B en D). Het R genoom is afkomstig van rogge en het H genoom van gerst. Elk genoom heeft als basisgetal 7 chromosomen. Van deze chromosomen worden de korte en lange arm respectievelijk met S en L aangeduid. Genetische kaarten zijn belangrijk omdat dan via merker-geassisteerde selectie meer precies kan gekruist worden. De loci *Pm1*, *Pm3*, *Pm4* en *Pm5* bezitten meerdere allelen, respectievelijk 4, 10, 2 en 4. Hsam en Zeller (1997) toonden aan dat ook *Pm8* meerdere allelen (2) bezit. Bhullar et al. (2010) onderzochten uit diverse genbanken verschillende tarwerassen die afkomstig waren uit 20 verschillende landen en concludeerden dat *Pm3* zelfs 17 verschillende allelen bevat.

Tabel 1 - Relevante *Pm* genen, hun oorsprong en chromosomale locatie

Resistentiegen	Differentiële cultivar	Chromosoom	Oorsprong
<i>Pm1</i>	Anfield	7AL	<i>Triticum aestivum</i>
<i>Pm1a</i>	Axminster	7AL	<i>Triticum aestivum</i>
<i>Pm2</i>	Galahad	5DS	<i>T. aestivum</i> / <i>Aegilops tauschii</i>
<i>Pm3a</i>	Asosan	1AS	<i>T. aestivum</i>
<i>Pm3b</i>	Chul	1AS	<i>T. aestivum</i>
<i>Pm3c</i>	Sonora	1AS	<i>T. aestivum</i>
<i>Pm3d</i>	Broom	1AS	<i>T. aestivum</i>
<i>Pm3f</i>	Michigan Amber	1AS	<i>T. aestivum</i>
<i>Pm4a</i>	Khapli	2AL	<i>T. dicoccum</i>
<i>Pm4b</i>	Weihenste	2AL	<i>T. carthlicum</i>
<i>Pm5a</i>	Hope	7BL	<i>T. dicoccum</i>
<i>Pm5b</i>	Ibis	7BL	<i>T. aestivum</i>
<i>Pm6</i>	Holger	2B	<i>T. timopheevii</i>
<i>Pm7</i>	Transec	4BS-4BL (2RL)	<i>Secale cereale</i>
<i>Pm8</i>	Kavkaz	1BL (1RS)	<i>S. cereale</i>
<i>Pm9</i>	Normandie	7AL	<i>T. aestivum</i>
<i>Pm12</i>	Normandie	6BS-6SS 6SL	<i>A. speltoides</i>
<i>Pm17</i>	Amigo	1 AL (1RS)	<i>S. cereale</i>
<i>Mld</i>	Maris Dove	4B	<i>T. durum</i>
<i>MISi2</i>	Sicco	Onbekend	Onbekend

Nog steeds worden verschillende nieuwe resistentiegenen 'ontdekt' in species verwant aan *T. aestivum*. De meeste *Pm* genen vinden hun oorsprong in 'wild types' van de *Triticeae*. *Pm7*, *Pm8* en *Pm17* zijn ingekruist vanuit rogge, wat een belangrijke bron is van resistentiegenen tegen verschillende pathogenen. Het is ook zo dat nog recentere *Pm* genen veelal nog niet ingekruist zijn in commercieel beschikbare tarwe variëteiten. Echter zijn wel de moleculaire merkers beschikbaar om dit snel te verwezenlijken. Ook in cultivars van *T. aestivum* zelf kunnen zich nog niet beschreven resistentiegenen bevinden en aldus zijn deze ook een bron van resistentie (Hsam en Zeller, 2002).

Huang en Röder (2004) beschreven verschillende manieren waarop deze genen dan kunnen gekruist worden in tarwe, zoals in de voorbije decennia werd gedaan. Wanneer de donorplant met het nieuwe interessante *Pm* gen nauw verwant is aan *Triticum*, kan dit vaak overgebracht worden via homologe crossing-over. Wanneer de donorplant slechts ver verwant is aan *Triticum* zijn andere methodes nodig die steunen op recombinant DNA procedures (Hsam en Zeller, 2002). Meerdere resistentiegenen in één cultivar aan de hand van 'gene pyramiding' zal leiden tot meer duurzame resistentie. Rasspecifieke resistentie is op lange termijn niet erg duurzaam. McDonald en Linde (2002) beschreven het cyclische 'boom and bust' systeem waarbij resistentie initieel efficiënt is, maar later selectie optreedt in de pathogeen populatie naar virulentie, veelal na een mutatie in het *avr* gen. Deze raakt vervolgens wijd verspreid waardoor de rasspecifieke resistentie verdwijnt.

Het is vaak niet duidelijk welke *Pm* genen de voorouders van onze huidige triticale rassen hadden. Ook zijn er de afgelopen decennia talloze (terug)kruisingen gebeurd tussen triticale onderling en met verschillende soorten tarwe en rogge, waardoor het van de huidige generatie triticale niet meer geweten is welke de tarwe- en roggeouders waren. Door virulentiespectra op te stellen met verschillende meeldauw isolaten, is het mogelijk om de aanwezigheid van bepaalde *Pm* genen in triticale te achterhalen.

2.3.2.2 Beschrijving van relevante rasspecifieke *Pm* genen in Europese rassen

Belangrijk in de bespreking van *Pm* genen is dat er heel veel regionale verschillen bestaan. Virulentiefrequenties ten opzichte van deze genen zullen afhangen van de meeldauw populatie en deze kan sterk verschillen tussen verschillende gebieden. Een *Pm* gen dat resistentie biedt, is ook niet noodzakelijk direct inpasbaar in nieuwe cultivars. Zo kunnen andere agronomische eigenschappen meespelen, die negatief beïnvloed worden door het gen.

Hsam en Zeller (2002) vatten het voorkomen en de resistentie samen van enkele van de meest aanwezige *Pm* genen in de tarwe 'gene pool'. Svec en Miklovicova (1998) onderzochten de situatie voor Centraal-Europa en stelden dat de genen(combinaties) *Pm3b*, *Pm2+mld* en *Pm1+2+9* nog resistentie verschaffen, terwijl *Pm5* (beide allelen), *Pm6* en *Pm8* quasi volledig doorbroken zijn. *Pm4b* is nog sterk onderworpen aan regionale verschillen: in Hongarije biedt het resistentie, in Tsjechië niet.

De combinatie *Pm2* en *Pm6* wordt nog vaak gebruikt, met wisselend succes en sterke regionale verschillen. Beiden waren lang twee van de meest betrouwbare resistentiegenen tegen meeldauw. Li et al. (2005) onderzochten de aard van *Pm2* resistentie in verschillende cultivars en merkten hier sterke verschillen op. In sommige genetische achtergronden slaagt *Pm2* er helemaal niet in om de HR respons te bewerkstelligen.

Resistentie gecodeerd door *Pm5* en *Pm6* is in de meeste gevallen in Europa doorbroken (Svec en Miklovicova, 1998), maar de combinatie wordt in Duitsland wel nog veel gebruikt. Beiden kunnen ze echter wel nog resistentie aanbrengen in volwassen planten (partiële resistentie). *Pm5b* wordt ook wel nog *mli* genoemd.

Pm7, *Pm8* en *Pm20* zijn resistentiegenen uit het rogge genoom. In het triticale genoom zijn ze eventueel aanwezig door homologe crossing-over. Wil men ze in tarwe binnen brengen, dan gebeurt dit via enkele backcross generaties en translocatie. *Pm7* vermindert echter opbrengst en biedt slechts beperkte resistentie. *Pm8* was lang een zeer populair resistentiegen maar is nu quasi volledig doorbroken; niet enkel in Europa maar ook in China en de VS. Onderzoek van Lillemo et al. (2010) toonde aan dat *Pm8* nog steeds het meest verspreidde resistentiegen in Scandinavië is. Andere frequent voorkomende allelen zijn *Pm5a*, *Pm3d*, *Pm3f*, *Pm3b* en *Pm2*.

Ook *Pm17* vindt zijn oorsprong in rogge maar dit gen blijkt een allel te zijn van *Pm8*. Het leidt echter tot een sterkere resistentie dan *Pm8*, hoewel dit in vele gevallen slechts zo is in het volwassen stadium van de plant en sterke infectie kan optreden bij zaailingen.

De meeste *R* genen in planten coderen voor NBS-LRR eiwitten (nucleotidebindingsplaats met C-terminaal domein met leucine rijke herhalingen). Een minderheid codeert voor receptor proteïnes en –kinasen met leucine rijke herhalingen (Niu en He, 2009). Hoewel er duidelijk al veel *Pm* genen genetisch bestudeerd werden, is nog maar één gen gekloond en dit is *Pm3b* door Yahiaoui et al. (2004). Zij toonden aan dat dit *Pm3b* gen behoort tot de cluster van resistentiegenen die coderen voor CC-NBS-LRR eiwitten ('coiled coil – NBS-LRR') op het tarwe chromosoom 1A.

Uit gerst zijn wel al meerdere *R* genen gekloond, waaronder verschillende op de *m1a* locus. Deze coderen allemaal voor NBS-LRR eiwitten, wat doet vermoeden dat ook bij tarwe deze vaststellingen zullen gemaakt worden. Resistentie is namelijk op vele vlakken geconserveerd gebleven bij deze planten.

2.3.2.3 *Pm* genen voor partiële resistentie

Enkele *Pm* genen coderen niet voor rasspecifieke resistentie. Expressie van deze genen leidt tot partiële resistentie, of ook nog kwantitatieve of horizontale resistentie genoemd. Dit wordt gecodeerd door vele 'minor' genen die een cumulatief effect hebben, in tegenstelling tot de 'major' genen van de rasspecifieke resistentie. Partiële resistentie volgt niet het gen-om-gen model, in de zin dat geen specifieke effectors noodzakelijk zijn om deze respons uit te lokken.

Lillemo et al. (2008) beschreven in de tarwe cultivar 'Saar' *Pm38* en *Pm39* als genen die voor dit type resistentie coderen, deze bevinden zich op dezelfde loci als de genen die tegen bladroest en gele roest resistentie bieden. De resistentiegenen *Pm5* en *Pm17* zijn eveneens een bron van resistentie in volwassen planten (Hsam en Zeller, 2002). Deze coderen echter ook voor rasspecifieke resistentie, die in het geval van *Pm5a* en *Pm5b* echter bijna volledig doorbroken is. Ook *Pm17* biedt enkel in het volwassen stadium resistentie tegen meeldauw.

Het inschatten en de identificatie van partiële resistentie gebeurt in veldproeven met volwassen planten (Lillemo et al., 2010). Yu et al. (2001) beschreven een manier om deze partiële resistentie te meten. Een collectie isolaten wordt gebruikt waarvan de corresponderende virulentiefrequentie op de *Pm* genen gekend is, dit wil zeggen dat men van deze populatie kan inschatten in hoeverre de

rasspecifieke resistentie nog intact is. Wanneer bepaalde te onderzoeken cultivars een lagere infectiegraad vertoonden dan verwacht bij deze ziektedruk, worden deze aanzien als cultivars met een hoge partiële resistentie. Om de te verwachten infectiegraad in te schatten moet natuurlijk geweten zijn in hoeverre rasspecifieke resistentie een rol speelt bij de specifieke interactie.

Mede door het 'storende' effect van rasspecifieke resistentie op het identificeren van partiële resistentie, is er nood aan moleculaire merkers om deze resistentie te kunnen vaststellen in tarwe. Lillemo et al. (2008) vonden in de tarwecultivar Saar merkers geassocieerd met *Pm38* en *Pm39*, loci die ook resistentie tegen bladroest en gele roest coderen.

Deze resistentie door 'minor' genen is volgens Lan et al. (2010) minder onderhevig aan de evolutionaire afbraak zoals beschreven door McDonald en Linde (2002), die bij rasspecifieke resistentie wel belangrijk kan zijn. Daarom is partiële resistentie ook duurzamer. Moleculaire merkers voor dit soort resistentie zijn in vergelijking met rasspecifieke resistentie nog weinig bekend. Onderzoek naar 'quantitative trait locis' (QTLs) om deze duurzame resistentie te kunnen kloneren komt recent meer op de voorgrond.

2.3.3 Postuleren van resistentiegenen

Het identificeren van *Pm* genen in een nieuwe of onbekende tarwecultivar gebeurt vaak aan de hand van infectie met een verzameling *B. graminis f. sp. tritici* isolaten met gekend virulentiespectrum. Deze isolaten kunnen duidelijk discrimineren tussen verschillende cultivars met gekende *Pm* genen, met andere woorden het is geweten voor welke *Pm* genen de isolaten corresponderende avirulentie genen bevatten. Deze methode werd onder andere beschreven door Hsam en Zeller (2002).

Lillemo et al. (2010) voerden deze postulatie uit en werkten hierbij volgens 2 stappen. In een eerste stap werd onderzocht welke isolaten op een bepaalde cultivar een compatibele reactie uitlokten. Er werd dan gesteld dat deze cultivar niet de *Pm* genen kan bevatten, waarvan geweten is dat de isolaten corresponderende avirulentie genen bevatten. In een 2^e stap vergeleek men het infectiepatroon op de cultivar met de infectiepatronen van de gekende isolaten. Wanneer een infectiepatroon identiek blijkt te zijn, dan bevat de onbekende cultivar het/de *Pm* gen(combinatie) horend bij dit patroon. Deze groep infectiespectra waarmee vergeleken wordt, zijn te vinden in standaardtabellen; het spreekt voor zich dat dan ook dezelfde isolaten moeten gebruikt worden voor de postulatie bij de onbekende cultivars. Door mutaties in het genoom van de isolaten is het echter mogelijk dat effectoren niet meer herkend worden als avirulentie factoren, en er toch een compatibele reactie kan optreden. Hierdoor zou deze methode niet meer volledig opgaan.

Onderzoek naar *Pm* genen in triticale cultivars vereist echter een andere aanpak, aangezien *B. g. f. sp. tritici* isolaten deze niet infecteren. Isolaten afkomstig van triticale zijn hier noodzakelijk, die zoals geweten ook veelal tarwe kunnen infecteren. Vanzelfsprekend zijn dan geen standaardtabellen beschikbaar met het infectiepatroon van deze isolaten. Deze moeten zelf opgesteld worden door pathogeniciteitstesten uit te voeren met tarwe cultivars waarvan de *Pm* samenstelling gekend is. Dit geeft dan de infectiespectra waarmee moet vergeleken worden bij de postulatie van de *Pm* genen in de ongekende (triticale) cultivars (zie verder materiaal en methoden). Doordat niet de standaard collectie *B. g. f. sp. tritici* gebruikt wordt, maar zelf verzamelde isolaten die slechts over de tijdspanne van het onderzoek gebruikt worden, kan ook een antwoord geboden worden op het gevaar van mutaties in het genoom van de isolaten.

Recente vorderingen in het klonen van (allelen op) *Pm* loci kunnen uitsluitend bieden over het al dan niet aanwezig zijn van een allel. Tommasini et al. (2006) beschrijven merkers die gebruikt kunnen worden voor detectie van de verschillende allelen op *Pm3*. Ook voor *Pm8* bestaat een merker beschreven door Koebner (1995). Ook stambomen kunnen een indicatie geven over het al dan niet aanwezig zijn van bepaalde *Pm* genen, deze zijn echter vaak onduidelijk. Ook kunnen allerlei combinaties van resistentiegenen aanwezig zijn, met een niet gekend resistentiepatroon als gevolg.

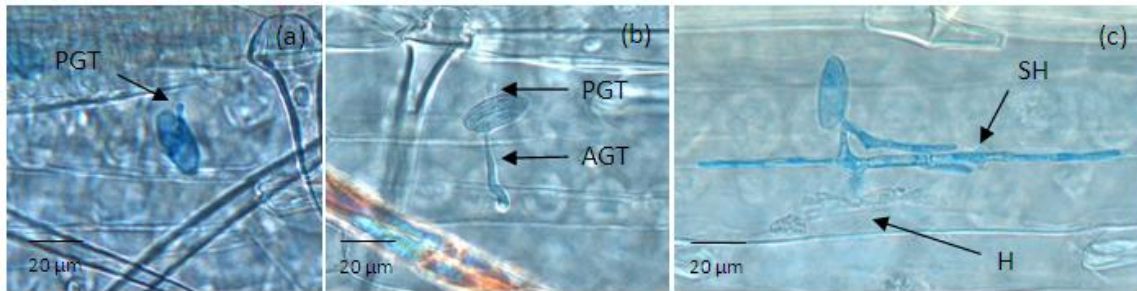
2.4 Resistentie tegen meeldauw: microscopisch

2.4.1 Infectieproces

Wanneer een conidium op een gevoelige plant landt, starten verschillende processen. De droge conidia maken vloeibaar extracellulair materiaal aan met esterase en cutinase, samen met andere stoffen vormt dit de extracellulaire matrix (ECM). De werking van deze stoffen verzwakt de cuticula waardoor de spore zich beter kan aanhechten. Zhang et al. (2005) stelden dat *B. graminis* enzymatische activiteit vertoont vanaf 30 minuten na inoculatie, met name cutinase dat de cuticula verzwakt. Ze stelden de ECM voor als een kanaal voor wederzijds transport tussen de plantencel en het conidium. Carver et al. (1999) onderzochten de samenstelling van deze extracellulaire matrix en concludeerden dat verschillende eiwitten aanwezig waren. Pryce-Jones et al. (1999) stelden de aanwezigheid van het enzyme cellobiohydrolase 1 (een cellulase) vast. Het belang van door de conidia gesecreteerd esterase werd door recent onderzoek bevestigd (Feng et al., 2011).

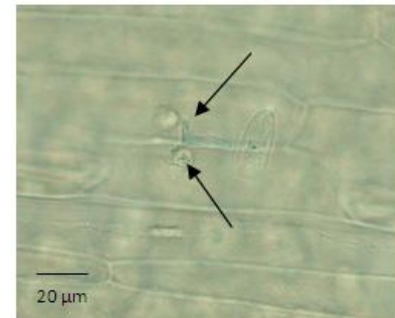
De voor *Blumeria graminis* unieke primaire kiembuis (PGT) wordt gevormd 30 tot 90 minuten na contact. Deze vormt vervolgens op zijn tip een cuticulaire pin die enkel de cuticula van de cel doordringt en niet de celwand. Edwards (2002) onderzocht deze processen bij gerst en stelde vast dat de cuticulaire pin reeds vanaf 3 uur (na infectie) gevormd wordt. Hij stelde ook dat via deze cuticulaire pin, het conidium water en oplosbare stoffen uit de celwand kan opnemen. Dit verklaart waarom ook onder droge condities conidia kunnen kiemen. Wellicht gebeurt het doordringen van de cuticula enkel enzymatisch door cutinase. Mechanische druk zou ook de celwand aantasten en dit is volgens Edwards (2002) niet het geval bij *B. graminis f. sp. hordei*.

Volgens de literatuur wordt vanuit de spore vervolgens een appressoriale kiembuis (AGT) gevormd die zich over het bladoppervlak verlengt als hyfe. Dit proces start 3 à 4 uur na infectie stopt deze groei en zwelt de tip van de AGT op tot appressorium. Ongeveer 12 uur na infectie wordt vanuit het appressorium een penetratiepin of infectiepin gevormd die bij een compatibele reactie de cuticula, de celwand en de gevormde papillae doordringt. Deze pin ontwikkelt zich dan tot een primair gelobd haustorium dat de plasmamembraan en het cytoplasma naar binnen wegduwt. Op deze manier wordt de plasmamembraan niet onderbroken. Dit heet een invaginatie van de plasmamembraan. De PGT, AGT en het gelobd haustorium zijn te zien in figuur 1 (respectievelijk 1a, 1b en 1c).



Figuur 1 - Infectieproces van *B. graminis*. PGT = Primaire kiembuis; AGT = Appressoriale kiembuis; SH = Secundaire hyfe; H = Haustorium

Op het bladoppervlak ontstaat een netwerk van hyfen dat het typische witgekleurd mycelium vormt. Secundaire appressoria worden gevormd in deze hyfen, die na penetratie secundaire haustoria zullen aanleggen. Van een echte compatibele interactie is maar sprake vanaf dit punt, gezien de plant de pathogeen nog altijd kan stoppen na aanleg van het primair haustorium (Freialdenhoven et al., 1994). Zichtbare haustorium vorming is echter niet noodzakelijk voor het opstarten van de HR (Li et al., 2005). Indien de infectiepin er niet in slaagt om binnen te dringen, kan vanuit de AGT een secundaire appressoriale lobe ontstaan die opnieuw aanleiding geeft tot een appressorium (figuur 2).



Figuur 2 - Appressoriale lobes bij *B. graminis*

De cuticula en celwand worden doorbroken via een combinatie van enzymatische activiteit en mechanische druk als gevolg van turgordruk, deze laatste is vooral bij de penetratie van de papillae van belang. Pryce-Jones et al. (1999) onderzochten bij *B. g. f. sp. hordei* de enzymatische en mechanische activiteit aan de tip van de AGT en stelden een turgordruk van 2 tot 4 MPa vast. Ook de aanwezigheid van het enzym cellobiohydrolase 2 werd bevestigd.

Er ontstaat via een extrahaustoriale matrix een complexe interactie tussen het haustorium en het extrahaustoriale membraan. Deze laatste is een gemodificeerde celmembraan van de plantencel. Rond de plaats waar de wand van de celwand werd doorbroken is callose aanwezig als een soort nekband, afkomstig van de gevormde papillae. Via een combinatie van actief en passief transport worden voedingsstoffen van de plant protoplast getransporteerd naar de protoplast van de schimmel. De pathogeen scheidt effectoren af die bij een geslaagde infectie functioneren als virulentiefactoren, en kunnen bijdragen tot het vormen van het haustorium en het herprogrammeren binnen de epidermale cel.

Over de defensiemechanismen van de plant volgt verder meer. De meeste studies gaan over de reacties die de AGT en meer bepaald het appressorium uitlokt, zoals vorming van een al dan niet efficiënte papilla. Papillae of celwand-afzettingen (CWA) worden ook gevormd als antwoord op PGT vorming zoals Li et al. (2005) aantoonde aan de hand van DAB-kleuring van H_2O_2 .

2.4.2 Verdedigingsmechanismen van de plant

Op vlak van verdediging van de Triticeae tegenover *B. graminis*, werd het meest onderzoek gedaan naar de interactie tussen gerst (*Hordeum vulgare*) en *B. graminis f. sp. hordei*. De genetische ouders van triticale zijn tarwe (*Triticum*) en rogge (*Secalis*), bijgevolg zullen resistentiegenen aanwezig in gerst niet van toepassing zijn in triticale. Toch wordt in de volgende paragrafen regelmatig verwezen naar deze genen en hun werking, ervan uitgaande dat de mechanismen op dezelfde principes steunen in tarwe. Dit is een geldige assumptie aangezien voor alle *Triticeae* de 7 chromosomen grotendeels dezelfde genetische informatie dragen en de genetische loci op de chromosomen gelijkaardig gesitueerd zijn (Linde-Laursen et al., 1996).

Op vlak van de specifieke verdedigingsmechanismen bij triticale is nog zeer weinig tot geen onderzoek gedaan. Ook moleculair onderzoek naar de mechanismen bij tarwe hinkt nog ver achterop in vergelijking met gerst (Niu en He, 2009). Er wordt in het vervolg van de tekst regelmatig gewag gemaakt van onderzoeken die van eerder beschreven eiwitten in gerst, homologe versies vinden in tarwe.

2.4.2.1 Non-host resistentie

Herkennen van de indringer

Planten herkennen vrijwel alle micro-organismen als vreemde indringers en hebben hiertegen een niet-gastheer specifieke ('non-host') resistentie ontwikkeld. Deze basisresistentie is ras-onafhankelijk en is een fenomeen dat steunt op het cumulatief effect van meerdere genen tegelijkertijd (Wilson et al., 2001). Het gaat om een basisresistentie waartegen succesvolle micro-organismen een oplossing moeten vinden. Het steunt op het proces van 'nonself recognition' waarbij de plantencel moleculen herkent die afkomstig zijn van micro-organismen. Deze moleculen of elicitoren zijn microbiële geassocieerde moleculaire patronen of MAMPs ('Microbial Associated Molecular Patterns') en pathogeen geassocieerde moleculaire patronen of PAMPs ('Pathogen Associated Molecular Patterns').

Ze worden door pathogeen-herkenningsreceptoren of PRRs ('Pattern Recognition Receptors') herkend die zich in de plasmamembraan van de epidermale cellen bevinden. Onder andere chitine (onder de vorm van chitine-oligomeren) en glukaan zijn bij schimmels voorbeelden van PAMPs. Chitine oligomeren worden gevormd wanneer chitine, aanwezig in de celwand van de fungus, afgebroken wordt door plant chitinase. Ook derivaten van cutine die ontstaan door inwerking van het cutinase dat de schimmel afscheidt, kunnen optreden als elicitoren. Welke PRRs precies verantwoordelijk zijn voor het herkennen van deze stoffen is nog niet volledig duidelijk. Kaku et al. (2006) ontdekten bij rijst een chitine-oligosaccharide elicitor-bindend proteïne met PRR functie.

Garcia-Brugger et al. (2006) onderzochten wat er gebeurt na herkenning door PRRs. 'Mitogen-activated protein kinase cascades' (MAPK – MAPKK – MAPKKK) zouden een rol spelen in de signaaltransductie, net als eiwit fosforylaties. Finaal wordt productie van reactieve zuurstof species ('reactive oxygen species' of ROS) bewerkstelligd, alsook transcriptie van tal van enzymen voor antimicrobiële stoffen en 'pathogenesis-related' (PR) proteïnen. Het cytoskelet wordt ingrijpend gepolariseerd naar de plaats van potentiële penetratie, wat essentieel is voor het aanleggen van papillae door de plant. Componenten hiervoor worden met vesikels aangebracht.

Papilla (CWA)

Deze papillae zijn plaatselijke verdikkingen en verstevigingen, en bestaan onder andere uit beta-1,3-glucaan, polyfenolen en callose (Zeyen et al., 2002). Het zijn apoplastische afzettingen die nauw verbonden zijn met een reorganisatie van het actine skelet van de cel na appressorium vorming door de schimmel. Bij een compatibele reactie worden minder veranderingen in de actine configuratie opgemerkt. De celwand zelf ondergaat proteïne 'cross-linking' met organische en anorganische moleculen om de cel ontoegankelijk te maken. Virulente isolaten zullen doorheen deze papillae kunnen groeien en de cel penetreren. De papilla wordt dan de nek van het haustorium dat de extrahaustoriale matrix afscheidt van de buitenwereld.

CWAs accumuleren H_2O_2 wat ze makkelijk detecteerbaar maakt (Li et al., 2005; zie verder). H_2O_2 kan voor de penetratiepen rechtstreeks toxisch zijn en bijdragen aan de versteviging van de celwand. Aan de tip van de appressoria produceert *B. graminis* catalase wat de werking van het door de plant geproduceerde H_2O_2 moet verhinderen (Zhang et al., 2004). Li et al. (2005) vonden bij tarwe een significant verschil in efficiënte papillae tussen compatibele en incompatibele interacties, wat het belang van deze verdediging ook bij tarwe bevestigt. Bij geopeneteerde papillae is geen of minder H_2O_2 te vinden (Li et al., 2005).

Reactieve zuurstof deeltjes (ROS)

Een typisch gebeuren bij de afweerreactie is de oxidatieve 'burst' waarbij reactieve zuurstof deeltjes of ROS gevormd worden, dit is een hoofdzakelijk apoplastisch fenomeen. Het superoxide anion en waterstofperoxide zijn de primaire producten, maar ook aan stikstofdioxide wordt een belangrijke rol toegeschreven. Voor de productie van de ROS staan voornamelijk NADPH-oxidasen (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase) in, die ook 'respiratory burst oxidase homolog' (RBOH) worden genoemd. Ze bevinden zich in de plasmamembraan van de cel. Ook celwand peroxidasen spelen hierbij een rol (Torres et al., 2009).

Nadat de plant een MAMP heeft waargenomen, verandert de permeabiliteit van de plasmamembraan. De Ca^{2+} en H^+ concentratie in het cytoplasma stijgt terwijl die van K^+ en Cl^- daalt (McDowell en Dangl, 2000). Calcium is een belangrijke boodschapper voor de activatie van de oxidatieve 'burst' door zijn bijdrage aan alkalinisatie (Garcia-Brugger et al., 2006).

De apoplast is bij de eerste verdedigingslinie van de plant het belangrijkste draagvlak. Vroeg in het infectieproces daalt Ca^{2+} en H^+ concentratie in de apoplast en treedt alkalinisatie op, terwijl het cytosol acidificatie ondergaat. Tijdens penetratie door de schimmel wordt echter een pH daling in de apoplast vastgesteld, die noodzakelijk kan zijn voor het succes van de penetratie (Hückelhoven, 2007). Alkalinisatie van de apoplast treedt sterker op bij resistente variëteiten en wordt gestimuleerd door de primaire kiembuis die uniek is bij *B. graminis*. Ze is belangrijk voor de activatie van de ROS-producerende peroxidasen terwijl NADPH oxidasen steunen op de Ca^{2+} concentratie in het cytosol. Er zijn verschillende modellen beschreven over hoe Ca^{2+} dit bewerkstelligt (Shetty et al., 2008). Volgens Liu et al. (2007) speelt ook verdeling van ijzer ionen een rol bij activatie van de oxidatieve burst.

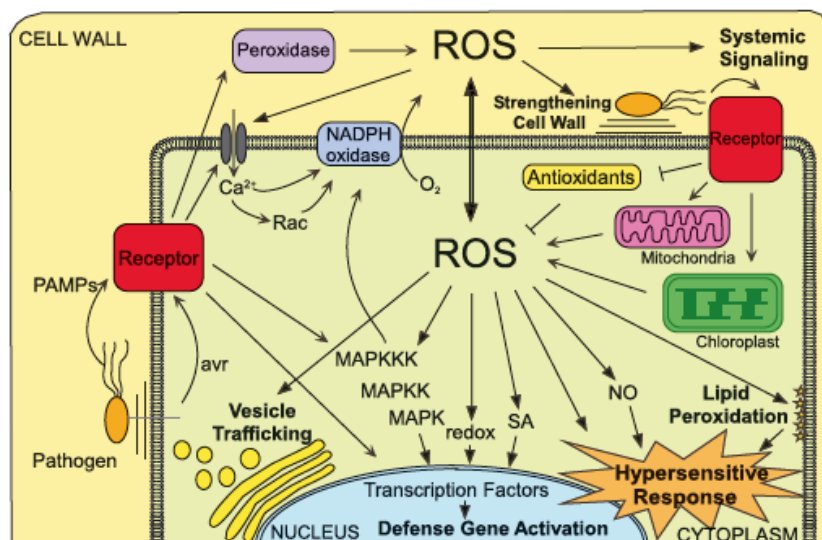
ROS productie na contact met conidia van *B. graminis* treedt op in verschillende fasen. Herkenning van de elicitors afgeleid van stoffen zoals chitine en polygalacturonasen leidt tot ion fluxen en een apoplastische alkalinisatie, en uiteindelijk tot een apoplastische ROS burst. Later kan ook herkenning

van effectoren door R proteïnes leiden tot een nog sterkere productie die finaal leidt tot de hypersensitieve respons. In dit laatste geval spelen ROS dan ook een belangrijke rol binnenin de cel (Torres et al., 2009). Maar ook virulente pathogenen op gevoelige waardplanten zullen een gematigde oxidatieve burst opwekken.

De rol van de oxidatieve 'burst' is heel divers. De ROS kunnen rechtstreeks toxisch zijn voor de pathogeen, met name H_2O_2 kan de groei van de penetratiepen negatief beïnvloeden. Ook wordt vooral aan O_2^- vaak een boodschapper functie toegeschreven aangezien deze stof probleemloos vanuit de apoplast doorheen de plasmamembraan kan migreren, waar het vervolgens in het cytosol verdere functies kan uitvoeren.

H_2O_2 vorming is vooral geassocieerd met papillae-vorming, beide processen zijn meest uitgesproken bij *mlo*-resistentie zoals verder besproken zal worden. De stof kan ook een rechtstreekse rol spelen in het verstevigen van de celwand: ze speelt een rol in proteïne cross-linking en lignificatie van de celwand. NO heeft voor de plant een eerder antagonistische rol aangezien ze de celwand losser kan maken en ze hierdoor meer geschikt maken voor penetratie.

Een overzicht van de complexe interacties waarmee ROS productie geassocieerd is, is te vinden in figuur 3.



Figuur 3 - Defensiemechanismen waarmee ROS productie geassocieerd is (Torres, 2009)

ROS vorming in verband met de aanleg van papillae en de hypersensitieve respons (zie verder) werd vooral beschreven bij gerst (Hückelhoven en Kogel, 2003). Li et al. (2005) onderzochten echter de situatie bij tarwe en keken hierbij naar vier componenten in de ROS productie: als reactie op de PGT, als reactie op de AGT, tijdens papillae vorming en ten laatste als onderdeel van de HR. Hun tijdsreeks baseerden ze op kennis in verband met *B. g. f. sp. hordei* bij gerst, waarbij papillae vorming vooral belangrijk is tussen 12 en 24 hai, en HR tussen 24 en 48 hai. H_2O_2 productie werd histochemisch bepaald met DAB kleuring (Thordal-Christensen et al., 1997), wat ook in deze thesis gebruikt werd (zie materiaal & methoden).

Ze stelden vast dat H_2O_2 accumuleerde in CWA in epidermale cellen, ter hoogte van de PGT en de AGT, zowel in resistente als gevoelige cultivars. Accumulatie onder de PGT vond vroeger plaats dan onder de AGT; in het eerste geval nam deze af na 12 hai, bij de AGT startte H_2O_2 productie slechts 14

hai om te blijven stijgen tot 20 hai. Men onderzocht ook H₂O₂ vorming in/rond papillae ter hoogte van het appressorium. Bij 'geslaagde' papillae die niet door de plant gepenetreerd worden, is H₂O₂ in vesikels op te merken terwijl dit niet of veel minder het geval is bij inefficiënte (gepenetreerde) papillae; dit werd eerder ook bij gerst beschreven. Ze onderzochten ook een compatibele reactie, tussen aangepaste *B.g. f.sp. tritici* en tarwe. Efficiënte papillae (geassocieerd met H₂O₂ in vesikels) en HR kwamen hier ook voor, maar in veel mindere mate dan bij resistente cultivars.

Anti-microbiële stoffen

Naast mechanische verdediging, past de plant ook actieve verdediging toe tegen de pathogeen in de vorm van anti-microbiële stoffen zoals fytoalexines. Andere stoffen die in de apoplast worden teruggevonden als onderdeel van de afweerreactie zijn pathogeen gerelateerde of PR ('pathogenesis-related') proteïnen. Deze omvatten onder andere chitinasen, glucanasen, peroxidasen en 'pathogenesis-related protein 1' (PR-1).

Salicylzuur – een belangrijke boodschapper molecule bij resistentie tegen biotrofe pathogenen – leidt tot activatie van systemisch verworven resistentie of SAR ('systemic acquired resistance') en is hiervoor ook noodzakelijk (Sticher et al., 1997). SAR gaat gepaard met de activatie van PR-genen. Deze coderen voor meerdere (kleine) eiwitten die tal van antifungale kenmerken kunnen hebben (Hückelhoven, 2007; Mou et al., 2003). Schultheiss et al. (2003) onderzochten de functie van PR-1 bij gerst en stelden vast dat het eiwit bijdraagt tot penetratie resistentie, en gecorreleerd is met H₂O₂ productie.

Deze signaaltransductie loopt volgens Mou et al. (2003) via de 'non-expressor' van het PR1 gen (NPR1). Het NPR1 eiwit zou gevoelig zijn aan veranderingen in de redoxstatus van de cel en de apoplast. Door het verzamelen van antioxidanten onder invloed van SAR, wordt het milieu meer reducerend; via een reductie wordt NPR1 dan actief en verplaatst het zich naar de kern van de cel. Daar activeert het ten slotte PR genen.

Niu en He (2009) verzamelden alle kennis rond de PR functie bij tarwe. Na infectie met *B.g. f.sp. tritici* namen de concentraties van PR-1, PR-2 (glucanasen), PR-5 (thaumatin-like proteins) en PR-9 (peroxidasen) toe in de epidermale cellen en soms ook in de mesofiel cellen. Bovendien was in resistente cultivars deze stijging sterker en vlugger dan in gevoelige cultivars.

2.4.2.2 Rasspecifieke resistentie

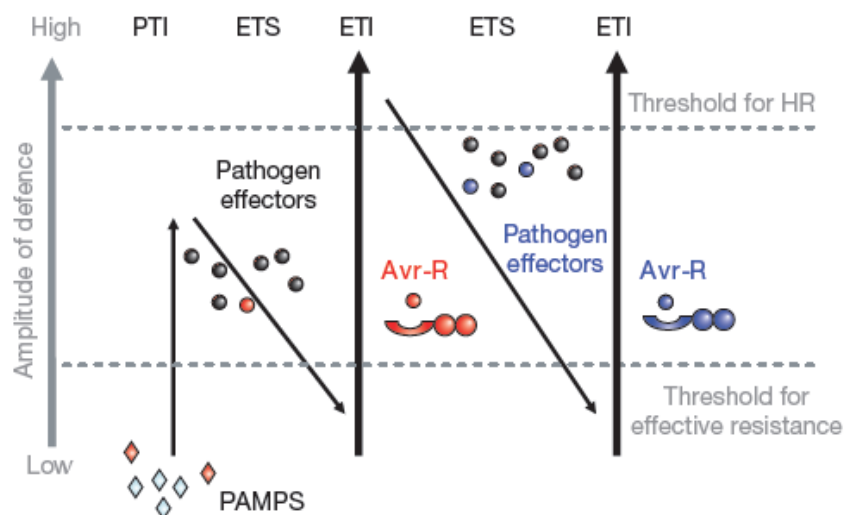
Het gen-om-gen concept

Het voorgaande beschreef de niet-gastheerspecifieke resistentie die pathogenen bij de meerderheid van planten remt in de groei. Deze PAMP-geactiveerde combinatie van anti-microbiële stoffen en celwand versteviging is veelal voldoende. Aangepaste micro-organismen zullen deze verdediging echter kunnen overwinnen door effectoren af te scheiden. Bij succesvolle infectie zal de plant deze stoffen niet herkennen en kunnen ze optreden als virulentie factoren. Hoe deze eiwitten dan precies bijdragen aan infectie en wat hun specifieke rol is in het infectieproces, is niet volledig geweten. Ze zijn in ieder geval belangrijk voor het overwinnen van PAMP geactiveerde immuniteit of PTI ('PAMP Triggered Immunity'), maar kunnen ook een structurele rol spelen zoals bij het vormen van de extrahaustoriale matrix.

Overwinnen van de PTI kan bijvoorbeeld door de oxidatieve ‘burst’ te onderdrukken, door de concentratie van ijzer ionen te beïnvloeden. Ook kunnen ze antioxidant systemen bevorderen om zo een lagere concentratie aan ROS te verkrijgen. Bij bacteriën zijn gevallen bekend waarbij effectoren callose afzetting verhinderen.

Bij een incompatibele reactie worden de effectoren wel herkend. Dit leidt tot een rasspecifieke resistentie die steunt op het gen-om-gen model zoals beschreven door Flor in 1955. Men noemt deze resistentie ook effector geactiveerde immuniteit of ETI (‘effector-triggered immunity’), dit is een versnelde en sterkere vorm van de PTI. Het wordt ook R-gemedieerde resistentie genoemd aangezien R-genen of resistentiegenen in de plant een duidelijk belangrijke rol spelen. De specifieke effectoren zijn producten van de avirulentie (*avr*) genen van de pathogeen, en ze worden in dit geval avirulentie factoren genoemd. Deze hebben dan complementaire R-genen in de plant.

Bij een succesvolle afweer van de pathogeen is ETI de laatste stap in de verdediging van de plant. Dit leidt vaak tot de hypersensitieve respons waarbij lokale celdood plaatsvindt. Bij een compatibele reactie, waarbij de effector niet herkend wordt, treedt ETI in mindere mate of niet op. Zimmerli et al. (2004) stelden dan ook vast dat dezelfde genen in de plant werden opgereguleerd bij deze twee interacties, maar dat er een kwantitatief verschil bestaat. Dit werd ook door Nimchuk et al. (2003) beschreven. Jones en Dangl (2006) stelden het hele proces grafisch voor (figuur 4).



Figuur 4 - Plant-pathogeen interactie (Jones en Dangl, 2006)

Het is duidelijk dat pathogenen meer kans op succesvolle infectie zullen hebben door het diversifiëren van de avirulentiegenen en door het verwijderen van de *avr* factoren die door de plant herkend worden. Door spontane mutaties en natuurlijke selectie zal de pathogeen inefficiënte effectoren afscheiden. Er is een co-evolutie van de R genen in de plant met de corresponderende effectoren in de pathogeen (Jones en Dangl, 2006).

Men weet niet precies hoe deze effectoren worden aangebracht. Ze kunnen herkend worden in de apoplast (extracellulaire matrix) maar ook binnenin de cel. Interactie tussen *avr* en NB-LRR eiwitten kan direct en indirect verlopen. Indirect kunnen NB-LRR eiwitten geactiveerd worden door de zogenaamde ‘pathogen-induced modified self’ moleculaire patronen. Deze ontstaan nadat de effectoren hun specifieke doel in de plantencel hebben aangetast. Directe interactie treedt op

wanneer de *avr* en R eiwitten binden. Verschillende *avr*/R interacties geven aanleiding tot activatie van MAP kinasen (mitogeen geactiveerde kinasen).

RAR1 en SGT1 zijn eiwitten die bij planten rasspecifieke verdediging regelen. Hun werking werd bij gerst al ruim gedocumenteerd (Freialdenhoven, 1994) en recent toonde Tai (2008) voor het eerst interactie aan tussen de tarwe homologen van deze eiwitten: TaRAR1 en TaSGT1. Azevedo et al. (2002) stelden vast dat SGT1 aanleiding geeft tot ubiquitinatie van eiwitten. Het verdedigingsmechanisme van de vele R-proteïnen die afhangen van RAR1/SGT1 zou dus kunnen steunen op het ubiquitineren van bepaalde proteïnen in de plantencel.

Rasspecifieke *Mla* resistentiegenen bij gerst zijn in de literatuur ruim beschreven. Het is een gen met verschillende allelen en het codeert net als *Pm3* voor 'coiled-coil' NB-LRR eiwitten. Jordan et al. (2011) vonden in *T. monococcum* een homoloog eiwit dat ze TmMLA1 noemden en dat een functioneel resistentie eiwit tegen meeldauw bleek te zijn, wat de gelijkenissen tussen tarwe en gerst op dit vlak illustreert.

WRKY zijn transcriptiefactoren in de celkern die bij normale werking resistentie onderdrukken. Bij gerst is een R-eiwit beschreven dat na activatie naar de kern migreert en daar bindt met HvWRKY1&2 om deze onderdrukking te verhinderen (Shen et al., 2007). Jordan et al. (2011) toonden aan dat TmMLA1 eveneens met deze transcriptiefactoren kan binden.

Hypersensitieve respons

Een typisch voorbeeld van rasspecifieke resistentie is de hypersensitieve respons (HR). Dit omvat celdood van de epidermale cel voor, tijdens of na vorming van het primair haustorium. De voor meeldauw noodzakelijke biotrofie wordt hierdoor onmogelijk gemaakt. Volgens Glazebrook (2005) is deze *R* gemedieerde resistentie dan ook enkel efficiënt tegen biotrofe schimmels. Ze wordt door *avr*/*R* interactie opgewekt.

Volgens Greenberg et al. (2004) treedt de HR op wanneer er voor een dominant R gen in de plant een overeenkomend dominant *avr* gen in de pathogeen is. Deze gen-om-gen reactie kan zoals gezegd direct of indirect gebeuren. Welke signalen tot HR leiden is nog niet volledig gekend, maar Heath (2000) stelde vast dat de oxidatieve 'burst' belangrijk is. Delledonne et al. (2001) onderzochten de rol van NO en H₂O₂ in HR. Ze stelden vast dat celdood in de eerste cellen waarschijnlijk onafhankelijk is van beide stoffen, maar verdere verspreiding steunt wel op beide stoffen. NO zou vooral belangrijk zijn voor het verspreiden van het signaal om de HR te starten (Zhang et al., 2003). Ook bepaalde ion fluxen zouden van belang zijn volgens Heath (2000), zoals een influx van calcium.

Li et al. (2005) onderzochten H₂O₂ productie in verband met HR bij de interactie tussen *B. graminis* f.sp. *tritici* en tarwe. Vanaf 14 hai merkten ze H₂O₂ productie op in mesofyl cellen in contact met de aangevallen epidermale cel. Vanaf 20 hai was ook in de aangevallen cel zelf duidelijk H₂O₂ aanwezig. HR wordt dus net als bij gerst (Vanacker et al., 2000) voorafgegaan door H₂O₂ accumulatie in aangrenzende mesofyl cellen.

Het is belangrijk de plaats van de HR respons in te zien in het verdedigingsmechanisme van de plant. Li et al. (2005) verwoordden het als de tweede verdedigingslinie van de plant, in geval de niet-gastheerspecifieke resistentie faalt. HR trad namelijk niet op in cellen waar efficiënte papillae-vorming er in was geslaagd penetratie te verhinderen. Een geadapteerde *formae specialis* van *B.*

graminis zal er in slagen de epidermale cel van de corresponderende gastheer te penetreren en een haustorium aan te leggen vooraleer de HR opstart (Freialdenhoven et al., 1994), en HR is enkel mogelijk als de R-genen overeenkomen met de *avr* genen in de pathogeen. Prats et al. (2006) onderzochten de reactie van tarwe op meeldauw infectie door niet aangepaste *formae speciales* en stelden vast dat infectie gestopt wordt door een combinatie van papillae vorming en celdood van de gepenetreerde cel.

Salicylzuur (SA) is een fytohormoon dat vooral belangrijk is bij bescherming tegen biotrofe pathogenen. Samen met ROS zal het de systemisch verworven resistentie (SAR) bewerkstelligen. Volgens Rairdan en Delaney (2002) is SA accumulatie eveneens noodzakelijk voor R-gemedieerde resistentie, althans in *A. thaliana*.

SA kan bijdragen tot hogere concentraties aan ROS, en dit door het verhinderen van de werking van ROS antioxidant systemen (Torres, 2009). Het kan echter ook een tegengestelde werking hebben. Torres et al. (2005) stellen dat cellen rond de infectieplaats door de werking van salicylzuur ook celdood zouden ondergaan, zonder de oxidatieve 'burst'. Op de plaatsen van NADPH-oxidase activatie zelf, treedt de hypersensitieve respons op door de werking van de ROS. Verder verwijderd houden ze celdood tegen, dit wil zeggen dat zelfs bij HR de werking van ROS niet ondubbelzinnig is.

2.4.2.3 Breedspectrum resistentie

Naast multigene niet-gastheerspecifieke en dominant enkel-gen rasspecifieke resistentie is *mlo*-resistentie bij gerst nog een derde soort. Dit is een breedspectrum resistentie want homozygote mutanten van Mildew locus o (*mlo*) zijn over het hele spectrum resistent tegen *B. graminis*. Resistentie zou hier niet afhankelijk zijn van de hypersensitieve respons en de weinige celdood die hier optreedt heeft geen verband met HR en is spontaan aanwezig (Peterhänzel et al., 1997). Deze ras-onafhankelijke resistentie is een gevolg van een mutatie in een membraan-gebonden proteïne MLO.

Onderzoek door Freialdenhoven et al. (1996) identificeerde twee genen, ROR1 en ROR2 ('required for *mlo*-resistance 1/2') die een regulerende en noodzakelijke functie hebben bij dit soort resistentie. Ze stelden een model voor waarbij *Mlo* wild-type allelen een negatief regulerende functie hebben. De mutante vorm is recessief waardoor enkel resistentie bekomen wordt bij homozygote planten. *Mlo* resistentie steunt op het stoppen van de pathogeen vooraleer het de cel kan binnendringen door middel van papillae vorming. Bij resistente *mlo*-genotypes gaat polarisatie van het actine cytoskelet sterker door dan bij andere isolaten. CWA vorming geschiedt dan ook sterker en vlugger.

Analoge genen werden bij tarwe voor het eerst door Elliott et al. in 2002 beschreven. Konishi et al. (2010) definieerden bij tarwe 7 *MLO* genen. Niu en He (2009) onderzochten verdere eigenschappen van de *MLO* eiwitten en ontdekten dat ze eveneens membraangebonden zijn en gelokaliseerd zijn op chromosomen 2A, 2B en 2D. Yu et al. (2005) zagen dat TaMLO transcriptie verhoogde na infectie. Verder onderzoek moet nog uitwijzen of mutanten in het *Mlo* gen, zoals bij gerst, een breedspectrum resistentie veroorzaken.

3 Materiaal en methoden

3.1 *Blumeria graminis*

In deze thesis werden 19 isolaten van *Blumeria graminis* gebruikt. Deze isolaten werden verzameld van op tarwe en triticale; en dit in Israël, België, Frankrijk en Polen (tabel 2). De isolaten uit België, Frankrijk en Polen werden verzameld in 2009 en 2010. De isolaten uit Israël komen uit de bekende Eshed en Dinoor collectie (Universiteit van Jeruzalem, Rehovot, Israël), verzameld begin de jaren '80. Deze 'oude' isolaten zijn zeer interessant om mee op te nemen in deze studie omdat het Midden Oosten wordt aanzien als de plaats van oorsprong van de graangewassen en eveneens van *Blumeria graminis*.

Tabel 2 – Waardplant en oorsprong van de *Blumeria graminis* isolaten

Isolaat	Waardplant	Oorsprong	Jaar
Bgt1 IS	<i>Triticum aestivum</i>	Yesodot, Israël	1980
Bgt2 IS	<i>Triticum aestivum</i>	Nahal Oz, Israël	1980
Bgt3 IS	<i>Triticum diccocooides</i>	Ami'ad, Israël	1980
Bgt1 BE	<i>Triticum aestivum</i>	Zwevegem, België	2009
Bgt2 BE	<i>Triticum aestivum</i>	Melle, België	2009
Bgt3 BE	<i>Triticum aestivum</i>	Verrebroek, België	2009
Bgt4 BE	<i>Triticum aestivum</i>	Bottelare, België	2009
Bgt5 BE	<i>Triticum aestivum</i>	Tongeren, België	2010
Bgt6 BE	<i>Triticum aestivum</i>	Zwevegem, België	2009
BgTR1 BE	Triticale	Bocholt, België	2010
BgTR2 BE	Triticale	Sint-Niklaas, België	2010
BgTR3 BE	Triticale	Bottelare, België	2010
BgTR4 BE	Triticale	Melle, België	2009
BgTR1 FR	Triticale	Drôme, Frankrijk	2010
BgTR2 FR	Triticale	Cappelle-en-Pévèle, Frankrijk	2010
BgTR3 FR	Triticale	Rennes, Frankrijk	2009
BgTR1 PO	Triticale	Polen	2009
BgTR2 PO	Triticale	Polen	2009
BgTR3 PO	Triticale	Polen	2010

Na staalname in het veld werd door middel van een penseeltje één kolonie van een geïnfecteerd blad overgezet op een nieuw bladschijfje van een gevoelige cultivar. Aan de hand van deze 'single colony techniek' wordt ervoor gezorgd dat het schimmelmateriaal zuiver en genetisch homogeen is.

De isolaten werden in stand gehouden en vermeerderd op bladschijfjes van twee weken oude zaailingen van de gevoelige cultivars, namelijk Cerco en Kanzler (tarwe) en Lamberto (triticale). Deze bladschijfjes werden in petriplaten op water agar (5 g agar L⁻¹) met benzimidazool (40 mg L⁻¹) gelegd. De geïnoculeerde petriplaten werden in de groeikamer geplaatst bij 16±1°C en een fotoperiode van 16 h licht. Om de twee weken werd de populatie overgebracht naar nieuwe bladschijfjes via het afschudden van conidia van de oude bladschijfjes naar de nieuwe. De zaailingen werden telkens tot twee weken opgekweekt in een groeikamer bij 18±1 °C en 16 h licht.

3.2 Virulentietesten

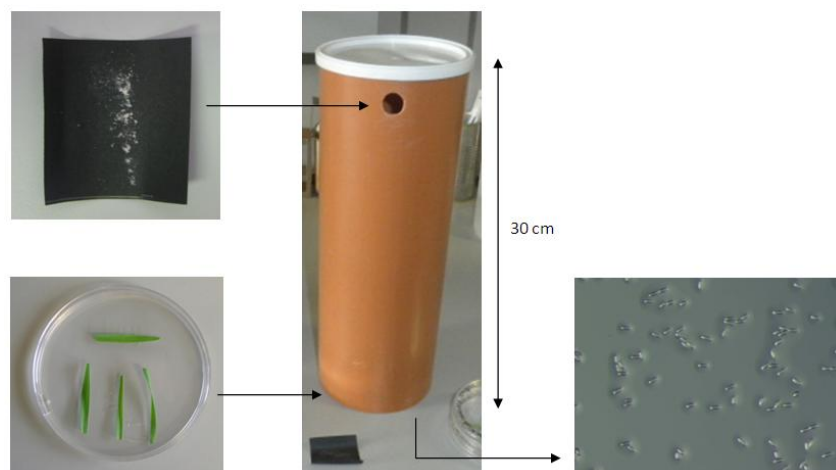
3.2.1 Plantmateriaal

De set van 19 isolaten werd getest op een set van verschillende potentiële waardplanten: 21 differentiële tarwe cultivars, 9 triticale cultivars en 1 rogge cultivar. Op deze manier werd van elk isolaat een volledig virulentiespectrum bekomen. In deze studie werden 19 tarwe cultivars getest met gekende resistentiegenen (*Pm*), alsook 2 cultivars zonder *Pm* genen (tabel 1 – literatuurstudie). Deze cultivars bevatten de meest voorkomende *Pm* genen gebruikt in de Europese tarwe-veredeling (Hsam & Zeller, 2002). Er werden ook 9 commerciële triticale cultivars getest van verschillende Europese veredelingsbedrijven en 1 gevoelige rogge cultivar. Van de triticale cultivars en de rogge cultivar is niets gekend over de aanwezigheid van resistentiegenen.

3.2.2 Inoculatie

Virulentietesten werden uitgevoerd op bladschijfjes in petriplaten zoals beschreven door Brown en Wolfe (1990). Voor elke inoculatie test werden 3 bladschijfjes plantmateriaal van de te testen cultivar op een petriplaat geplaatst. Per combinatie cultivar-isolaat werden twee herhalingen uitgevoerd. De bladschijfjes werden met de adaxiale zijde naar boven geplaatst. Per petriplaat werd ook een controle-bladschijfje gebruikt van een gevoelige cultivar; op deze manier kan een mislukte infectie nooit onterecht aanzien worden als resistentie van de te testen cultivar. De virulentietesten werden uitgevoerd op hetzelfde medium als dat voor het in stand houden en vermeerderen van de isolaten.

Inoculatie werd bewerkstelligd aan de hand van een inoculatie toren (103 mm aan de basis en 300 mm hoog) (Brown en Wolfe, 1990). Conidia worden aan de bovenkant van de toren binnengeblazen en dalen zo uniform neer op het plantmateriaal (figuur 5). Op deze manier werden de natuurlijke omstandigheden van infectie nagebootst. Er werden ± 20 sporen mm^{-2} geïnoculeerd.

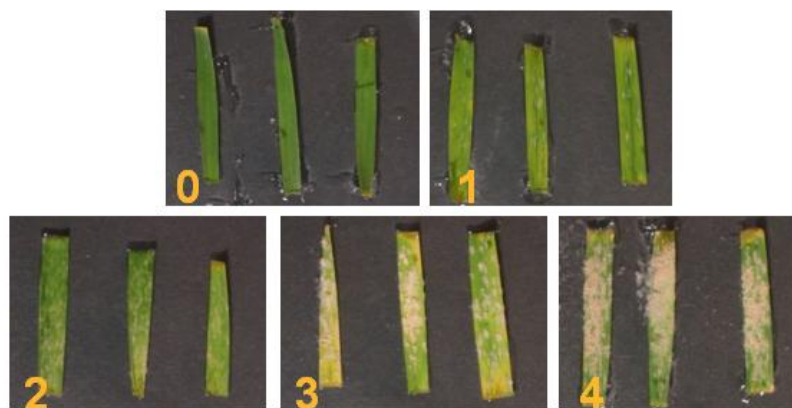


Figuur 5 - Inoculatieproces met uniforme verspreiding van conidia d.m.v. een inoculatietoren

Geïnoculeerde petriplaten werden in de groeikamer geplaatst bij 16 h licht en 16±1°C om sporulatie te bevorderen. Na twee weken werd de graad van infectie (ook IF, infectietype) gescoord volgens een gemodificeerd scoresysteem (Moseman et al., 1965) zoals weergegeven in tabel 3 en figuur 6.

Tabel 3 – Infectietypes van de virulentietesten twee weken na inoculatie

0	Geen zichtbare kolonies, soms necrotische vlekken
1	Kleine kolonies met weinig conidia
2	Beter ontwikkelde kolonies met weinig conidia
3	Goed ontwikkelde kolonies met veel conidia, niet aansluitende kolonies
4	Aansluitende kolonies met ontwikkelde hyfen en veel conidia



Figuur 6 - Infectietypes van de virulentietesten twee weken na inoculatie

De virulentiedata van de isolaten Bgt6 BE, BgTR4 BE, BgTR3 FR en BgTR3 PO zijn afkomstig uit het overkoepelend doctoraat van deze thesis.

3.2.3 Data analyse

Voor het verwerken van de virulentiedata werd telkens het ‘slechtste’ resultaat genomen, dit wil zeggen de sterkste infectie. De isolaat-cultivar interacties werden dan geclassificeerd als resistent (score 0-1), intermediair (score 2) of gevoelig (score 3-4). Wanneer intermediaire interacties nog wat langer in de groeikamer gelaten werden, bleken ook deze te neigen naar gevoelige interacties. Daarom werd voor de data analyse ook score 2 als virulent gezien, in analogie naar Parks et al. (2008).

Algemene analyse van de virulentietesten, en opstellen van de virulentiefrequenties gebeurde in Excel. Virulentiebomen werden opgesteld in TREECON, deze methode werd door Parks et al. (2008) beschreven voor het programma SNAP. Aan elk isolaat werd een binair virulentiefenotype toegekend. Op basis hiervan werd met behulp van TREECON Nei’s standaard genetische afstand tussen de isolaten berekend, ervan uitgaand dat een compatibele interactie overeenkomt met een mutatie in overeenkomstige avirulentiegen van het isolaat. Virulentiebomen konden dan opgemaakt worden door het ‘clustering’ algoritme met de ‘unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA)’. De bootstrap-procedure werd gevolgd om in te schatten in hoeverre de conclusies naar de hele pathogeen populatie kunnen geëxtrapoleerd worden. Er werden 100 bootstrap-iteraties uitgevoerd door TREECON.

3.3 Postulatie van resistentiegenen in triticale

Postulatie van resistentiegenen werd beschreven door onder andere Bennett (1984), Czembor (2001) en Lillemo et al. (2010). Het gen-om-gen principe beschreven door Flor (1955) ligt aan de basis van het mechanisme dat hier gebruikt werd. De gebruikte tarwe cultivars met gekende *Pm* genen werden hier gebruikt als 'differentiële lijnen' die een beeld geven van het infectiepatroon van de verschillende isolaten. Wanneer een 'te testen lijn' (dus een triticale cultivar) exact hetzelfde virulentiepatroon toonde over alle isolaten als een differentiële lijn, werden aan deze cultivars dezelfde *Pm* genen toegekend.

In een volgende stap werd bekeken welke avirulentie allelen de gebruikte isolaten zouden kunnen bevatten. Dit kan afgeleid worden uit de interactie met de differentiële tarwe lijnen. Een isolaat dat een bepaalde cultivar niet kon infecteren, (resistentie interactie: score 0 – 1) bevat het corresponderende avirulentie allel. Kon ditzelfde isolaat dan vervolgens een te testen cultivar wel infecteren, dan heeft deze cultivar het overeenkomstige *Pm* gen wellicht niet in zijn genoom.

3.4 Microscopisch onderzoek

3.4.1 Inoculatie

Uit de bekomen virulentiespectra werden twee isolaten geselecteerd om microscopisch te onderzoeken, het f. sp. *tritici* isolaat Bgt6 België en het triticale isolaat BgTR4 België. Deze ondergingen 'cross-infection' op een tarwe en een triticale cultivar via de inoculatietoren zoals hierboven beschreven. Opnieuw werden twee weken oude zaailingen gebruikt, en dit van de tarwe cultivar Holger en de triticale cultivar Lamberto. Holger bevat *Pm6* wat in Europa zeer vaak voorkomt en sterk verbonden is met de hypersensitieve respons (Li et al., 2005). Lamberto is een zeer gevoelige triticale cultivar.

Per interactie isolaat-cultivar werden verschillende petriplaten geïnoculeerd, telkens met ± 70 conidia/mm². Bladschijfjes werden opnieuw met de adaxiale zijde naar boven geplaatst en een controle werd toegevoegd aan de plaatjes. Petriplaten werden opnieuw in de groeikamer geplaatst om sporulatie te bevorderen. Een tijdsreeks (6hai – 8hai – 12hai – 16hai – 20hai – 24hai – 48hai – 72hai) werd gevolgd om het infectieproces via cytologische kleuringen op te volgen. Op elk tijdstip en voor elke kleuring werden drie bladsegmenten uit de bladschijfjes gesneden; er werd op gelet dat de drie herhalingen uit verschillende petriplaten kwamen. De bladnerf werd uitgesneden om later fixatie te vergemakkelijken.

3.4.2 Cytologische kleuringen

Het infectieproces werd gestopt en bladsegmenten werden ontkleurd in 5 ml alcoholisch lactofenol (1 volume fenol: glycerol: melkzuur: water (1:1:1:1) en 2 volumes ethanol). Ontkleuring gebeurde bij 90°C tot de bladsegmenten volledig vrij waren van chlorofyl (15-25 min). Op elk tijdstip, voor elke interactie en voor elke herhaling werden de ontkleurde bladschijfjes gekleurd in 6-well platen. Fixatie gebeurde met 70 μ l glycerol (70%) en detectie volgde aan de hand van de Olympus BX-51 microscoop. Foto's werden genomen met de Olympus Color View II camera en verwerkt met Cell-F.

Detectie van H₂O₂ productie gebeurde door DAB-kleuring (3,3'-diaminobenzidine), zoals beschreven door Thordal-Christensen et al. (1997). Zes uur voor ontkleuring (en dus voordat de infectie wordt

gestopt) werden de bladschijfjes vacuüm geïnfiltreerd door 1 mg ml^{-1} DAB (pH = 3,8) waardoor de intercellulaire ruimtes in het blad ook in contact kwamen met DAB. Tot het tijdstip van vastleggen bleven de bladsegmenten dan ondergedompeld in de DAB oplossing. Op elk tijdstip werden de DAB-geïnfiltreerde bladschijfjes dan ontkleurd, 2X gespoeld in gedestilleerd water en gefixeerd. DAB polymeriseert met H_2O_2 en is detecteerbaar onder wit licht als een bruine neerslag.

Polyfenolen werden onderzocht in verband met antimicrobiële eigenschappen en celwandversteving. Hiervoor werden ontkleurde bladschijfjes twee minuten gekleurd in een oplossing van 0,05% toluidine blauw en 50mM citraat buffer. Na twee maal wassen in gedestilleerd water en fixatie, lichten fenolische componenten geel op onder blauw licht epifluorescentie (Olympus U-MWB2, excitatie 450-480 nm). Dit protocol werd beschreven door O'Brien et al. (1964).

Om callose afzet geassocieerd met papillae vorming te detecteren, werd een protocol beschreven door Skalamera et al. (1997) gevolgd. Ontkleurde bladschijfjes werden gekleurd in een oplossing van 0,01% aniline blauw en 0,15M K_2HPO_4 , en gewassen in gedestilleerd water. Onder epifluorescentie met UV licht (Olympus U-MWU2 filter, excitatie 330-385 nm) is callose dan makkelijk detecteerbaar.

Tenslotte werd het infectieverloop van de pathogeen onderzocht door het kleuren van de spore, PGT, AGT en eventuele hyfen als gevolg van een geslaagde infectie. Het protocol van Hood en Shew (1996) werd hier gevolgd. Ontkleurde bladschijfjes werden vijf minuten gekleurd in een oplossing van 0,05% aniline blauw en 0,067M K_2HPO_4 , en vervolgens gewassen in gedestilleerd water. De voorgenoemde structuren kleuren blauw onder wit licht.

3.4.3 Data analyse

Per interactie werden 3 herhalingen of bladschijfjes getest, en per herhaling werden 50 conidia random over het bladoppervlak gescoord. Het gebruikte scoresysteem per cytologische kleuring is verder te vinden onder 'Resultaten'. Telkens werden de gemiddelden van de 3 herhalingen berekend en voorgesteld met de standaard deviatie. Scores werden omgezet naar percentages en zo weergegeven. Interessante data werden grafisch en waar nodig in een tijdsreeks voorgesteld, verwerking gebeurde met Excel.

Statistiek werd uitgevoerd via SPSS. Voor elke score afzonderlijk werden significante verschillen tussen de 4 verschillende interacties onderzocht. Statistische analyse verliep via de niet-parametrische 'Mann-Whitney' test ($\alpha = 0.05$).

4 Resultaten

4.1 Virulentietesten

De resultaten van de pathogeniciteitstesten van de 15 isolaten (7 *f. sp. tritici* isolaten en 8 triticales isolaten) op de 31 cultivars (21 differentiële tarwe cultivars en 9 te onderzoeken triticales cultivars) zijn weergegeven in tabel 4. Per combinatie isolaat-cultivar werden twee herhalingen uitgevoerd, telkens op 3 bladschijfjes, wat resulteerde in zes virulentiewaarnemingen per isolaat-cultivar interactie. Hierbij werd enkel de score corresponderend met de sterkste infectie weerhouden. Deze tabel werd aangevuld met data van een zesde tarwe isolaat en vierde triticales isolaat uit België, en van een triticales isolaat uit zowel Frankrijk als Polen. Dit geeft een totaal van 19 isolaten. De hieruit volgende conclusies kunnen een indicatie geven van de populatie van *B. graminis* op tarwe en triticales, maar deze extrapolatie moet met de nodige voorzichtigheid gedaan worden.

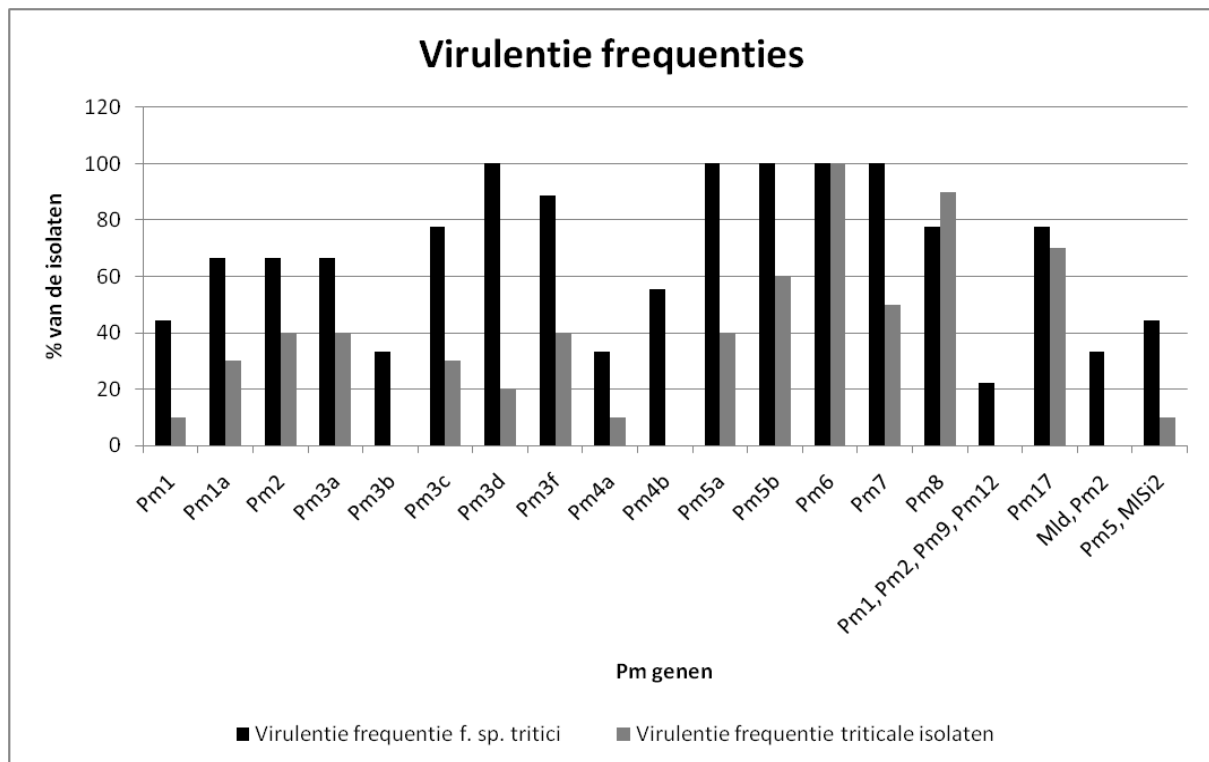
Geen enkele van de 9 *f. sp. tritici* isolaten was virulent op één van de geteste triticales (infectiescore vanaf 2). Alle *f. sp. tritici* isolaten infecteerden wel 12 tot 18 van de 21 differentiële tarwe cultivars. De 10 triticales isolaten vertonen een meer variabele respons op de differentiële tarwelijnen. Ze infecteerden 5 tot 13 tarwe cultivars. De triticales isolaten konden allen 8 van de 9 triticales cultivars infecteren. Eén cultivar werd nooit geïnfecteerd, namelijk Cultivo die dus nog volledig resistent is tegen het onderzochte deel van de populatie. De rogge cultivar werd door geen enkel isolaat in de proef geïnfecteerd.

Tabel 4 – Het virulentiepatroon van 9 isolaten van *B. g. f. sp. tritici* en 10 *B. g. triticales* isolaten op 21 differentiële tarwecultivars, 9 tritricale cultivars en 1 rogge cultivar. Bgt = *B. graminis f. sp. tritici*. BgTR = *B. graminis triticales*. IS = Israël, BE = België, FR = Frankrijk, PO = Polen.

Gastheer	Cultivar	Resistentiegen(en)	Bgt1 IS	Bgt2 IS	Bgt3 IS	Bgt1 BE	Bgt2 BE	Bgt3 BE	Bgt4 BE	Bgt5 BE	Bgt6 BE	BgTR1 BE	BgTR2 BE	BgTR3 BE	BgTR4 BE	BgTR1 FR	BgTR2 FR	BgTR3 FR	BgTR1 PO	BgTR2 PO	BgTR3 PO	
Tarwe	Kanzler	geen	3	4	4	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	4	3	
	Cerco	geen	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	0	4	4	4	4	4	2	1	1	3
	Anfield	Pm1	1	3	4	0	0	3	4	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
	Axminster	Pm1a	4	4	4	0	4	3	3	0	1	0	0	0	3	1	2	0	0	1	1	2
	Galahad	Pm2	0	0	0	4	4	3	3	3	4	0	0	0	0	3	4	0	2	0	0	4
	Asosan	Pm3a	1	0	2	4	3	4	4	4	3	0	1	1	0	0	3	0	0	4	4	4
	Chul	Pm3b	0	0	1	2	0	2	2	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	Sonora	Pm3c	2	0	3	3	0	4	4	4	3	4	0	0	0	1	1	0	3	1	4	4
	Broom	Pm3d	2	4	2	4	4	4	2	2	3	4	0	0	0	0	3	0	0	0	2	1
	Michigan Amber	Pm3f	4	3	3	4	0	2	2	2	2	4	0	1	0	3	3	1	1	4	1	4
	Khapli	Pm4a	0	1	0	4	4	0	1	1	4	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3
	Weihenste	Pm4b	4	0	0	1	1	3	4	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hope	Pm5a	2	4	4	2	2	2	4	4	4	3	3	2	2	0	1	1	4	0	1	1
	Iblis	Pm5b	4	4	4	4	4	3	4	4	3	4	0	3	3	4	2	2	0	0	0	4
	Holger	Pm6	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2	4	3	2	4	4	4	3	3	4
	Transec	Pm7	3	4	3	2	4	4	4	4	4	2	2	4	1	3	0	1	1	1	2	3
	Kavkaz	Pm8	3	0	4	2	4	0	0	3	3	4	2	2	1	4	2	2	4	3	4	4
	Normandie	Pm1, Pm2, Pm9, Pm12	0	0	0	0	0	0	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Amigo	Pm17	0	2	3	2	4	4	4	1	3	0	2	4	3	0	3	0	0	2	3	2
Maris Dove	Mid, Pm2	0	0	0	4	1	3	1	1	0	4	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	
Sicco	Pm5, MIS2	3	4	4	1	0	4	3	0	0	0	1	1	3	0	0	0	0	0	0	0	
Triticale	Lamberto	Niet gekend	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4	4	4	3	4	4	4	4	3
	Maximal	Niet gekend	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Borodine	Niet gekend	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4
	Talento	Niet gekend	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4	4	4	3	4	3	4	4	4	4	4
	Krakowiak	Niet gekend	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Partout	Niet gekend	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4	4	4	2	4	4	4	3	3	4	4
	Cultivo	Niet gekend	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ragtag	Niet gekend	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	4	4	4	4	3	3	3	4	4
	Joyce	Niet gekend	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	3	4	4	4	4	4
	CHD101	Niet gekend	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rogge																						

4.1.1 Virulentiefrequenties

Om een duidelijker beeld van de data te krijgen en gerichte conclusies over de populatie te kunnen maken, werden de virulentiefrequenties van de verschillende *B. graminis* isolaten van op tarwe en triticale berekend voor hun reactie op de verschillende tarwecultivars met gekende *Pm*-genen. Dit geeft een beeld van de virulentie van de isolaten op elke (a)virulentielocus, door procentueel weer te geven hoeveel van de isolaten de cultivars kunnen infecteren met elk overeenkomstig *Pm* gen. Grafisch resulteert dit in een grafiek waar voor elk *Pm* gen het percentage virulente *f. sp. tritici* en triticale isolaten is weergegeven (figuur 7).

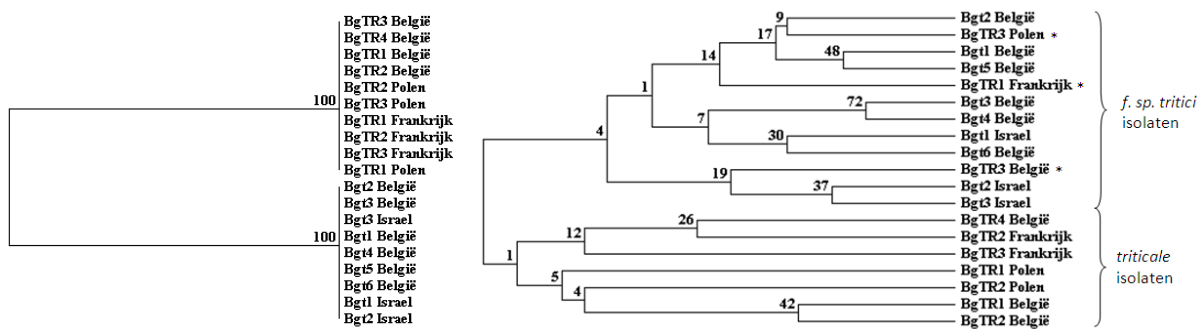


Figuur 7 – Virulentiefrequenties op tarwecultivars met gekende *Pm* genen na infectie met *B. graminis f. sp. tritici* en *B. graminis triticale*

Deze data illustreren dat globaal de triticale isolaten nog steeds minder virulent zijn dan de *f. sp. tritici* isolaten, en dit voor de meeste *Pm* genen onderzocht in deze thesis. Enkel voor *Pm8* overschreed de virulentie van de triticale isolaten deze van de *f. sp. tritici*. Enkele *Pm* genen werden door de triticale isolaten helemaal niet geïnfecteerd, en hun resistentie was ook bij de tarwe isolaten nog grotendeels intact. Het gaat hier over *Pm3b* en *Pm4b*; en de combinaties van *Pm1+Pm2+Pm9+Pm12* en *Mld+Pm2* in één cultivar. De triticale isolaten infecteerden vooral cultivars met *Pm5b*, *Pm6*, *Pm7*, *Pm8* en *Pm17*.

4.1.2 Virulentiebomen

Om een integraal zicht te krijgen op de volledige collectie isolaten, kunnen ook 'multilocus virulentie fenotypes' opgesteld worden. Isolaten die meer verschillen in virulentie fenotype, zullen ook meer verschillen in genetische samenstelling. Parks et al. (2008) stelden dat op basis van 'Nei's genetische afstand', er via TREECON betekenisvolle virulentiebomen kunnen opgesteld worden. De virulentiebomen op afzonderlijk de triticale en tarwe cultivars worden weergegeven in figuur 8.



Figuur 8 - Virulentiebomen na infectie met *B. graminis f. sp. tritici* en *B. graminis triticales*. Links: virulentieboom gebaseerd op infectie van tritricale cultivars. Rechts: virulentieboom gebaseerd op infectie van tarwe cultivars. Bgt = *Blumeria graminis f. sp. tritici*. BgTR = *Blumeria graminis triticales*. Het sterretje duidt tritricale isolaten aan die samenclusteren met de *f. sp. tritici* isolaten na infectie op de tarwe cultivars.

Zoals verwacht vormen de *f. sp. tritici* en tritricale isolaten volledig afzonderlijk clusters in de virulentieboom gebaseerd op infectie van tritricale cultivars. Dit wordt verklaard doordat geen enkel *f. sp. tritici* isolaat de tritricale cultivars kon infecteren terwijl de tritricale isolaten virulent waren op 8 van de 9 tritricale cultivars. Meer informatie kan gehaald worden uit de virulentieboom van de isolaten op de tarwe cultivars. De isolaten zijn hier veel meer gediscrimineerd. De tritricale isolaten clusteren grotendeels samen en delen een gelijkaardig virulentie fenotype: ze infecteerden een deel maar lang niet alle tarwe cultivars. Drie tritricale isolaten clusteren samen met de *f. sp. tritici* isolaten, dit waren de 3 meest virulente tritricale isolaten op tarwe, namelijk BgTR3 Polen, BgTR1 Frankrijk en BgTR3 België; aangeduid met ster in figuur 8. Geografisch is er geen duidelijk patroon van samenclusteren van isolaten terug te vinden. De rogge cultivar kon door geen enkel isolaat geïnfecteerd worden.

4.2 Postulatie van resistentiegenen in tritricale

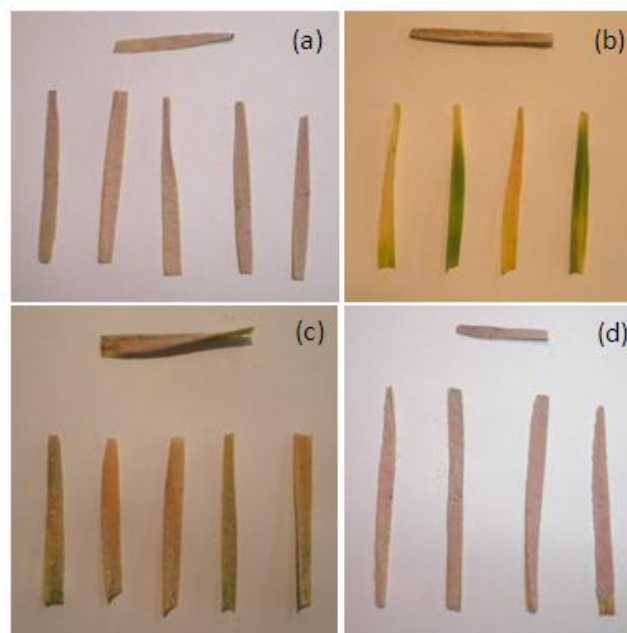
Postulatie steunt op het herkennen van incompatibele interacties van de isolaten met de differentiële tarwe cultivars, en compatibele interacties met de te testen tritricale cultivars. Zo kunnen *Pm* genen geëlimineerd worden voor elke cultivar. Aangezien geen enkel *f. sp. tritici* isolaat er in slaagde tritricale te infecteren, moet postulatie worden uitgevoerd met de tritricale isolaten.

Geen enkel isolaat slaagde erin de tritricale cultivar Cultivo te infecteren, dus conclusies omtrent aanwezige *Pm* genen kunnen hier via postulatie niet gegeven worden. Enkele voorbeelden van *Pm* samenstellingen in tarwe die dezelfde algemeen incompatibele respons uitlokten van de tritricale isolaten zijn *Pm3b*, *Pm4b*, en de combinaties *Pm1+Pm2+Pm9+Pm12* en *Mld+Pm2*. Via de postulatie methode is het echter niet mogelijk om te besluiten of één van deze samenstellingen al dan niet aanwezig is.

Met de tritricale isolaten was het niet mogelijk te discrimineren tussen de overige 8 tritricale cultivars. Wanneer nu de postulatie methode gebruikt wordt, zal verondersteld worden dat de cultivars op vlak van aanwezige *Pm* genen dezelfde genetische basis hebben. Na postulatie worden alle *Pm* genen buiten *Pm6* en *Pm8* uitgesloten van mogelijke aanwezigheid in tritricale.

4.3 Microscopisch onderzoek

Vier verschillende interacties werden onderzocht waarvan er in theorie twee compatibel (*f. sp. tritici* op tarwe, *triticales* isolaat op triticales) zijn, en twee incompatibel (*f. sp. tritici* op triticales; *triticales* isolaat op tarwe). Uit de virulentietesten bleek reeds dat deze laatste niet geheel incompatibel is, maar resulteert in een virulentiescore van 2 (matig ontwikkelde kolonies zonder veel conidia). Om betekenisvolle conclusies omtrent het microscopisch onderzoek te vormen, is het interessant om deze interacties eerst macroscopisch te bekijken (figuur 9). Figuur 9a en 9d tonen de volledige compatibele interacties: de kolonies zijn aaneensluitend, er is een rijkelijke mycelium vorming met veel conidia. Figuur 9b toont de volledig incompatibele interactie, en figuur 9c toont de intermediaire interactie. De foto's werden 2 weken na inoculatie genomen.

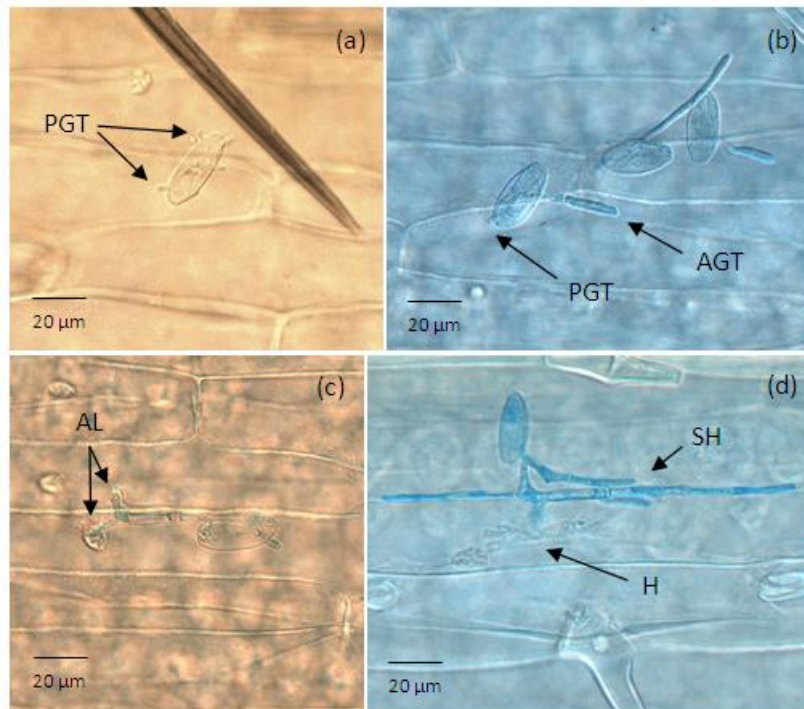


Figuur 9 – Macroscopisch beeld van de 4 onderzochte interacties. (a) *f. sp. tritici* op tarwe. (b) *f. sp. tritici* op triticales. (c) *triticales* isolaat op tarwe. (d) *triticales* isolaat op triticales.

In de tabellen en grafieken worden, om plaats te besparen, volgende belangrijke afkortingen gebruikt: Bgt voor *B. graminis f. sp. tritici* isolaten en BgTR voor *B. graminis triticales* isolaten.

4.3.1 Ontwikkeling van meeldauw

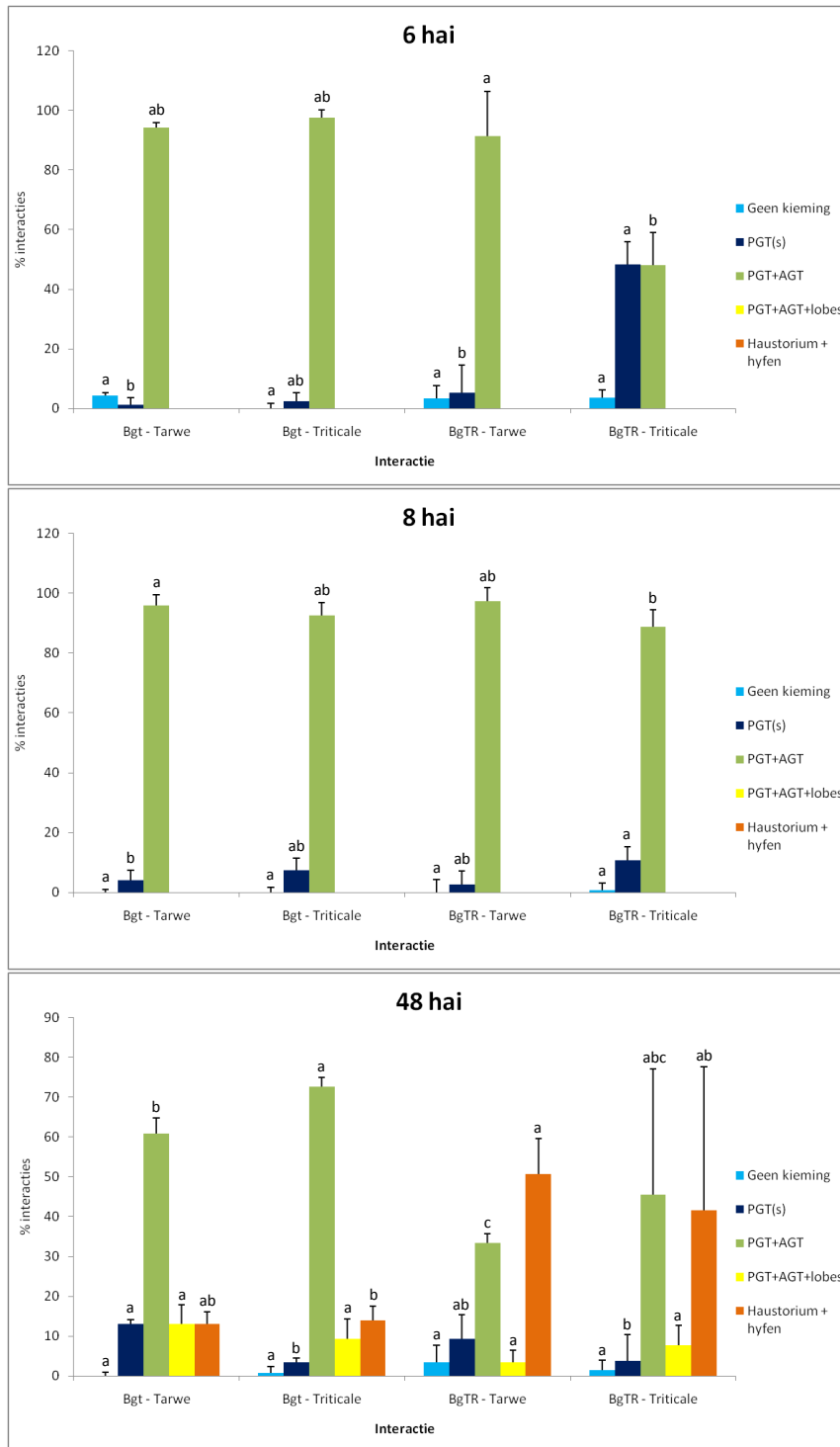
Om het infectieproces van meeldauw in de loop van de tijd op te volgen voor de vier verschillende interacties, werden 50 interacties per bladsegment gescoord volgens een scoresysteem met 5 klassen. Figuur 10 geeft de 4 verschillende klassen overeenkomstig met succesvolle kieming weer. Er werd ook nog een 5^e klasse onderscheiden die staat voor een niet gekiemde spore.

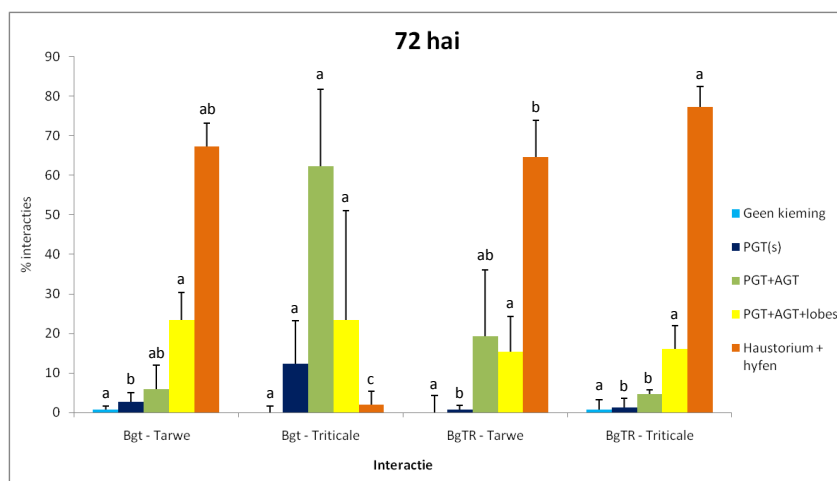


Figuur 10 - Verschillende klassen voor ontwikkeling van meeldauw. (a) Enkel vorming van één of meerdere PGT(s). (b) Vorming van PGT en AGT. (c) Vorming van PGT, AGT en appressoriale lobes (AL). (d) Vorming van haustorium (H) en secundaire hyfen (SH) na succesvolle infectie.

Op alle tijdstippen (6 – 8 – 12 – 16 – 20 – 24 – 48 – 72 hai) werd de ontwikkeling van meeldauw gescoord. Figuur 11 geeft grafisch de resultaten weer van 6, 8, 48 en 72 hai. Op 6 hai hadden 3 van de 4 interacties voor quasi alle conidia een AGT gevormd. Enkel bij het triticaal isolaat op de triticaal cultivar had nog maar 50% van de conidia dit gedaan. Tegen 8 hai was dit verschil weggewerkt en hadden ook deze sporen een AGT gevormd. Tot en met 20 hai ontwikkelden alle conidia zich dan gelijkaardig.

Op 24 hai bleek reeds dat het triticaal isolaat vlugger probeert te penetreren, aangezien er meer conidia met appressoriale lobes te vinden zijn. Op 48 hai bleek dan dat het triticaal isolaat de gastheer inderdaad vlugger koloniseert (vluggere aanleg van haustorium en secundaire hyfen), en dit zowel bij tarwe als bij triticaal. Van de triticaal conidia vormde 40 à 50% op 48 hai reeds haustoria en secundaire hyfen, tegenover 10% van de *f. sp. tritici* conidia. Op 72 hai was ook het *f. sp. tritici* isolaat bij tarwe geslaagd in infectie en hadden *B. graminis f. sp. tritici* – tarwe, *B. graminis triticaal* – tarwe en *B. graminis triticaal* – triticaal gelijkaardige niveaus (tussen 65 en 80%) van haustorium vorming en secundaire hyfen groei. Bij de incompatibele interactie van *f. sp. tritici* op triticaal werd er nagenoeg geen haustorium en groei van secundaire hyfen waargenomen.

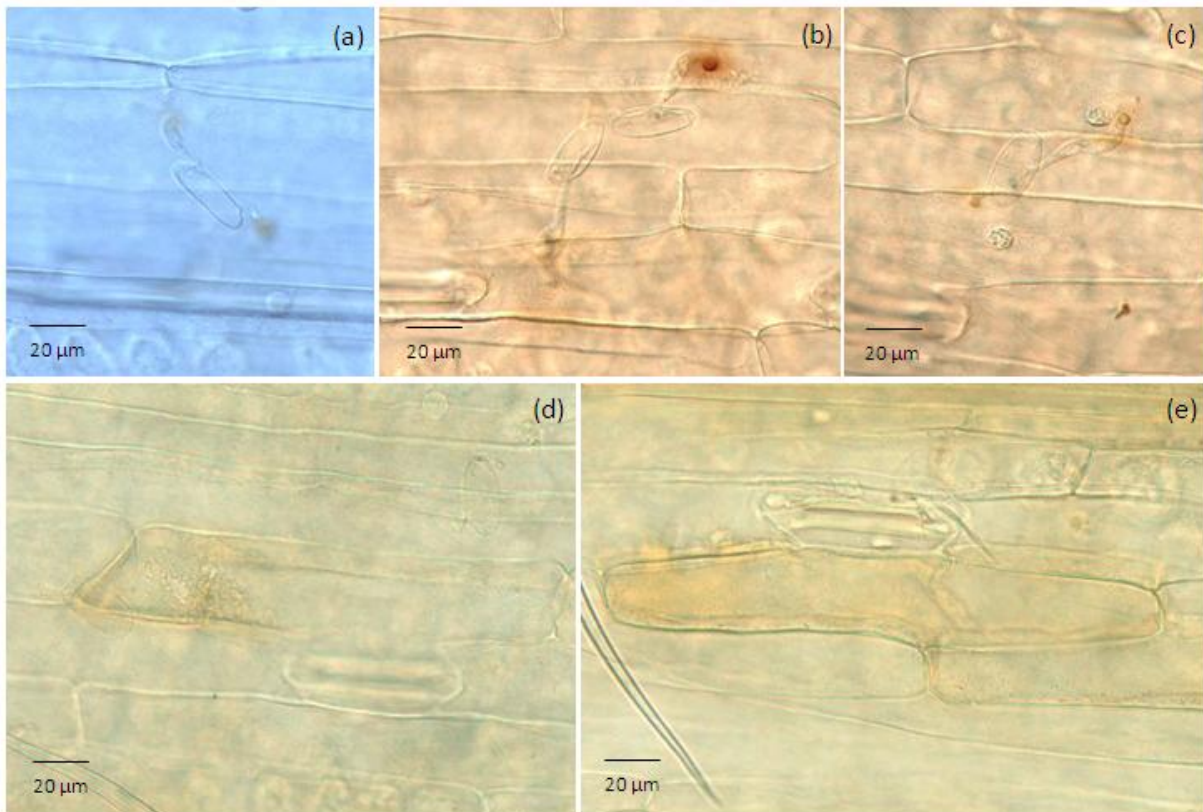




Figuur 11 – Ontwikkeling van *B. graminis f. sp. tritici* en *B. graminis triticales* over de tijd. Grafische weergave van de 4 interacties bij 6, 8, 48 en 72 hai. De data zijn gemiddelden en standaard deviatie van 3 herhalingen met telkens 50 interacties per blad. Verschillende letters geven voor elke klasse afzonderlijk statistisch significante verschillen aan tussen de verschillende interacties.

4.3.2 Histochemische kleuring van H₂O₂

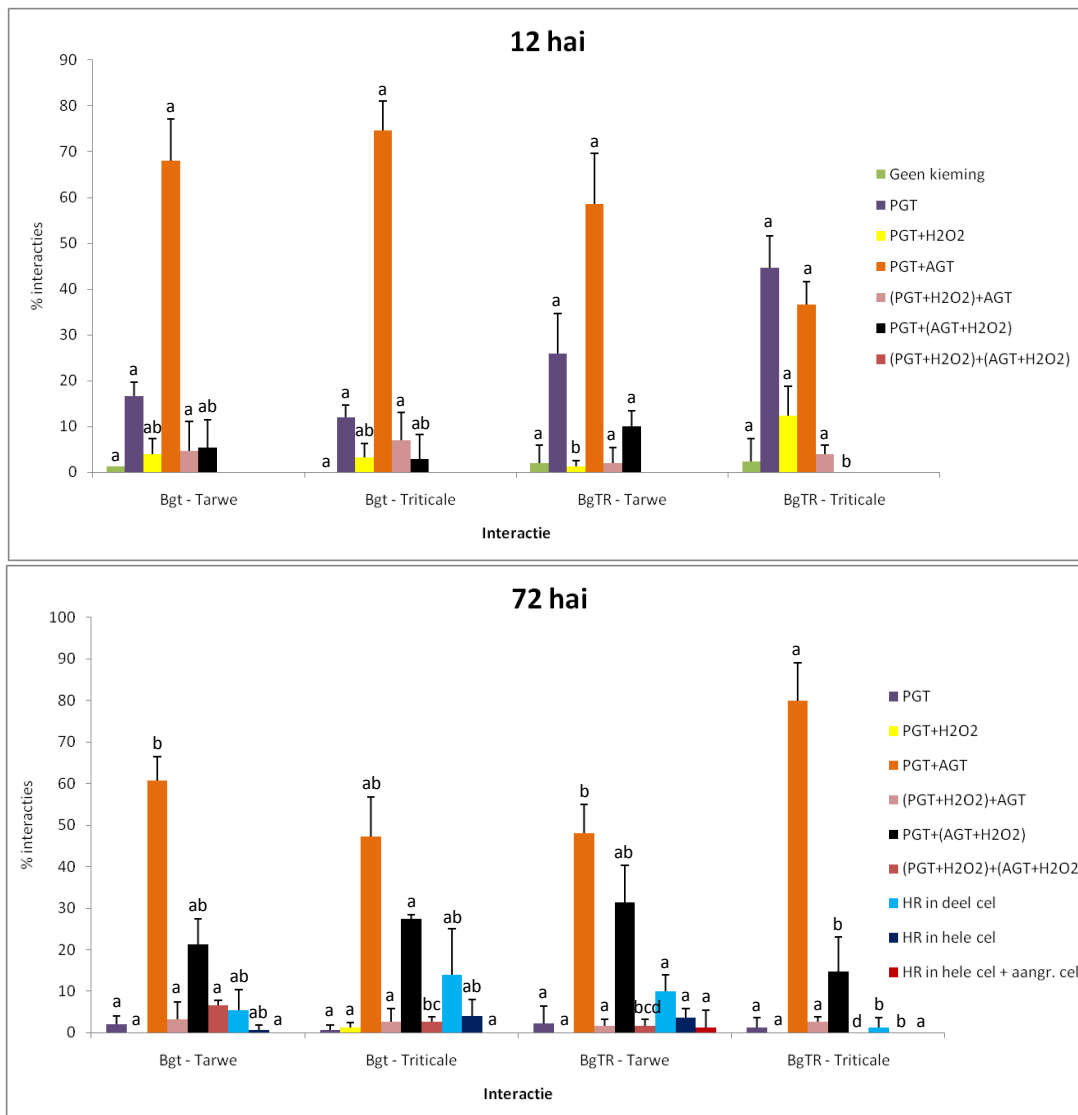
Voor de detectie van H₂O₂ werden er telkens 50 interacties per bladsegment gescoord en dit in 3 herhalingen. Tien verschillende klassen werden onderscheiden. Er werd een onderscheid gemaakt tussen detectie van lokaal H₂O₂ en hypersensitieve respons (HR). Lokale H₂O₂ productie is een rechtstreekse respons op de cuticulaire pin en penetratiepin uit respectievelijk de PGT en de AGT. HR daarentegen is een proces op celniveau. Bij H₂O₂ werd onderscheid gemaakt tussen volgende klassen: PGT, PGT+ H₂O₂, PGT+AGT, (PGT+ H₂O₂)+AGT, PGT+(AGT+ H₂O₂) en ten slotte (PGT+ H₂O₂)+(AGT+ H₂O₂). Als nulscore werd opnieuw geen kieming genomen. De score PGT+AGT omvat alle geslaagde infecties waarbij geen H₂O₂ gevormd wordt. Drie scores onderscheiden de HR: HR in een deel van de cel, HR in de volledige cel, en ten slotte HR in de volledige cel en aangrenzende cel(len). Figuur 12 toont enkele representatieve foto's.



Figuur 12 – Microscopische foto's van de verschillende processen met H_2O_2 productie na infectie door *B. graminis*. (a) (PGT+ H_2O_2) + AGT. (b) PGT + (AGT+ H_2O_2). (c) (PGT+ H_2O_2) + (AGT+ H_2O_2). (d) HR in een deel van de cel. (e) HR in de volledige cel.

Vier tijdstippen werden gescoord (12 – 24 – 48 – 72 hai). De resultaten van 12 en 72 hai worden weergegeven in figuur 13. Op 12 hai was niet veel lokale bruinkleuring door H_2O_2 productie te bemerken. Waarschijnlijk is H_2O_2 ten gevolge van de PGT hier alweer verdwenen. Het is duidelijk dat het triticale isolaat op triticale opnieuw nog niet alle AGTs had gevormd. Ook was hier wel nog bij ongeveer 15% van de conidia H_2O_2 vorming vast te stellen als respons op de PGT. Op 24 hai was bij beide interacties met het triticale isolaat H_2O_2 productie vast te stellen als gevolg van de infectiepin (20% van de conidia). Er wordt slechts zeer zelden een HR geïnduceerd bij de incompatibele reacties (5% van de conidia).

Bij 72 hai echter was het duidelijk dat de twee compatibele interacties het meeste gekiemde sporen zonder H_2O_2 productie (PGT+AGT: 60-80%) omvatten. Anders gezegd, de incompatibele reacties vertoonden de meeste interacties waarbij H_2O_2 productie en HR geïnduceerd werd. Door de grote hoeveelheid aan verschillende scores, geeft de grafiek op dit vlak echter een versnipperd beeld. Tabel 5 geeft over de tijd een som van de scores voor lokale H_2O_2 productie en HR. De incompatibele interacties lokten meer HR uit (18 en 15%) dan de compatibele reacties (6 en 1%) op 72 hai. Op vlak van lokale H_2O_2 productie kon maar één van de compatibele reacties zich onderscheiden van de rest. Zo leidden op 72 hai de interactie van het triticale isolaat op triticale slechts bij 17% van de conidia tot lokale H_2O_2 vorming, terwijl dit voor de andere interacties tussen de 31 en 34% bedroeg. Globaal gezien over de verschillende tijdstippen lokten de twee incompatibele reacties meer lokale H_2O_2 productie en HR uit dan de twee compatibele reacties.



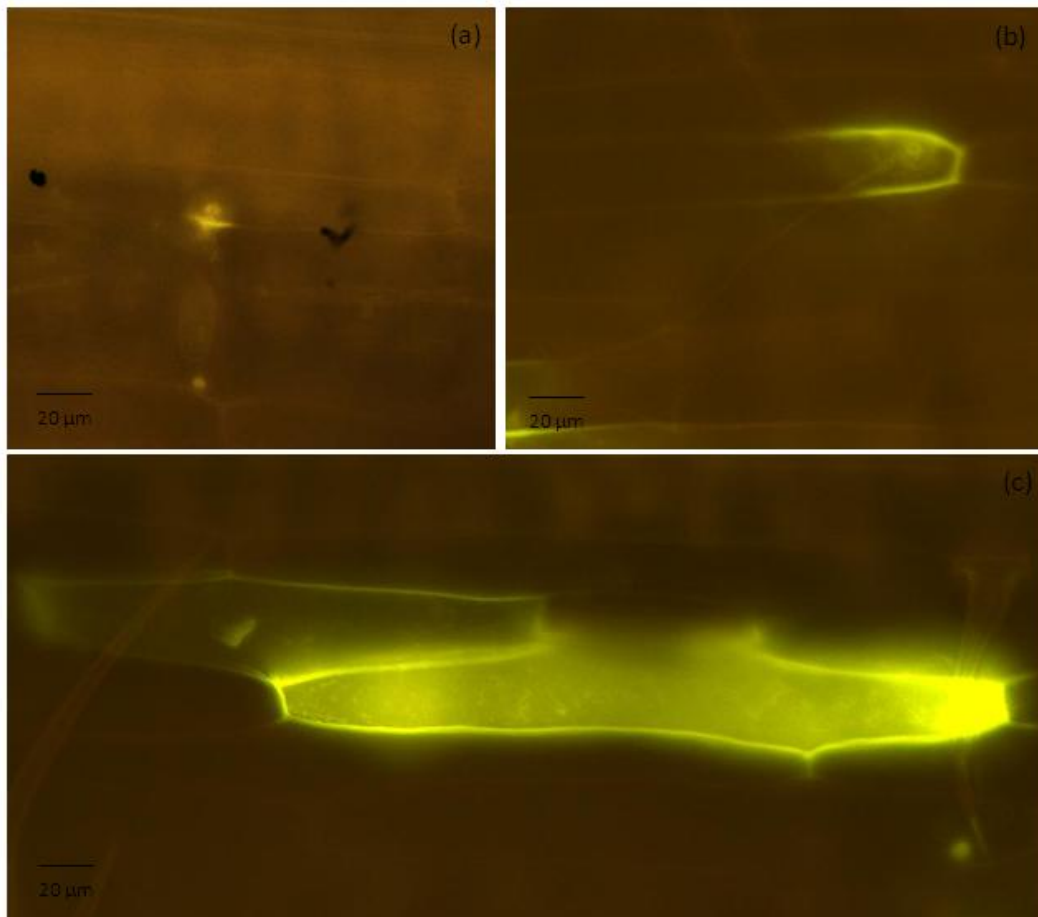
Figuur 13 – Lokale H₂O₂ productie en HR geïnduceerd door *B. graminis f. sp. tritici* en *B. graminis triticales*. Grafische weergave van de 4 interacties bij 12 en 72 hai. De data zijn gemiddelden en standaard deviatie van 3 herhalingen met telkens 50 interacties per blad. Verschillende letters geven voor elke klasse afzonderlijk statistisch significante verschillen aan tussen de verschillende interacties.

Tabel 5 - Percentage interacties die lokale H₂O₂ productie en HR induceren. De data zijn gemiddelden en standaard deviatie van 3 herhalingen met telkens 50 interacties per blad.

	Bgt - Tarwe	Bgt - Triticale	BgTR - Tarwe	BgTR - Triticale
Som H₂O₂				
[PGT+H ₂ O ₂] + [(PGT+H ₂ O ₂)+AGT] + [PGT+(AGT+H ₂ O ₂)] + [(PGT+H ₂ O ₂)+(AGT+H ₂ O ₂)]				
12 hai	14 ± 8,72	13,33 ± 4,04	13,33 ± 1,16	16,33 ± 7,77
24 hai	9,33 ± 4,62	7,33 ± 3,06	30 ± 24,25	20,67 ± 18,90
48 hai	21,33 ± 16,17	24 ± 20,30	12,67 ± 8,08	20,67 ± 9,45
72 hai	31,33 ± 5,03	34 ± 5,29	34,67 ± 8,33	17,33 ± 7,57
Som HR				
(HR in deel van de cel) + (HR in hele cel) + (HR in hele cel + aangr. cel)				
12 hai	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
24 hai	0 ± 0	6 ± 6	4 ± 6,93	1,33 ± 2,31
48 hai	10,67 ± 12,22	8 ± 7,21	7,33 ± 8,08	2,67 ± 4,62
72 hai	6 ± 6	18 ± 15,10	15 ± 7,94	1,33 ± 2,31
Som totaal				
Som H ₂ O ₂ + Som HR				
12 hai	14 ± 8,72	13,33 ± 4,04	13,33 ± 1,16	16,33 ± 7,77
24 hai	9,33 ± 4,62	13,33 ± 4,62	34 ± 30	22 ± 18,33
48 hai	32 ± 10,58	32 ± 13,12	20 ± 10,58	23,33 ± 11,72
72 hai	37,33 ± 6,11	52 ± 10,58	49,67 ± 10,97	18,67 ± 7,02

4.3.3 Histochemische kleuring van fenolische componenten

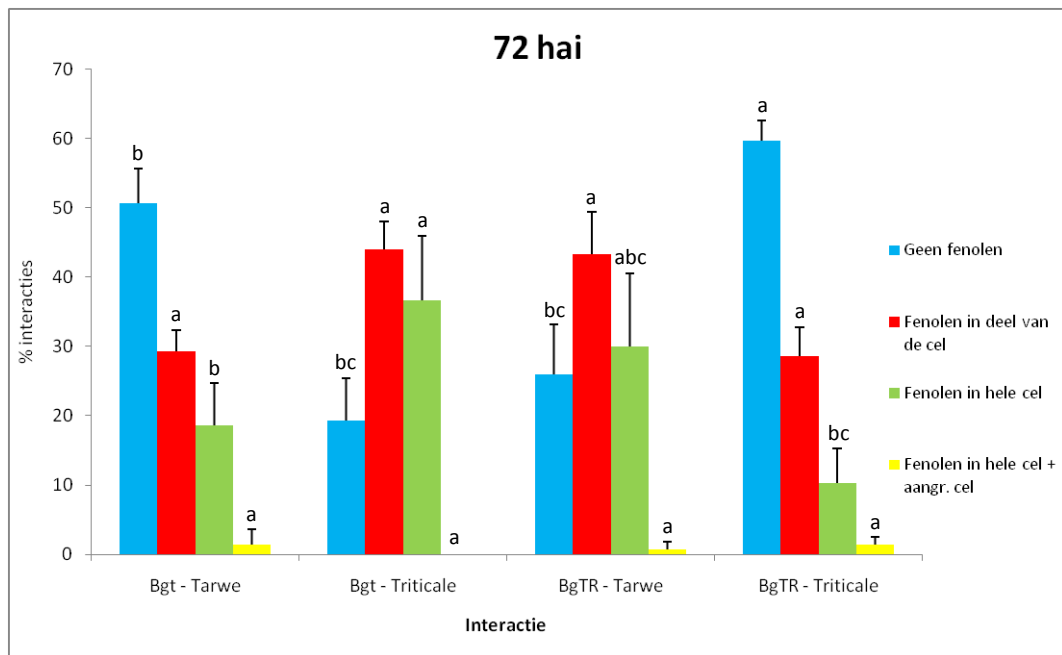
Voor de scoring van de accumulatie van fenolische componenten werden er 4 klassen onderscheiden. Detectie gebeurde onder blauw licht, de conidia werden echter opgespoord onder wit licht zodat ook de interacties zonder enige productie van fenolen meegerekend werden. De verschillende klassen waren: geen accumulatie van fenolische componenten, accumulatie van fenolische componenten in een deel van de cel, accumulatie van fenolische componenten in de hele cel, en ten slotte accumulatie van fenolische componenten in heel de cel en ook in aangrenzende cel(len). Wanneer enkel lokaal ten gevolge van al dan niet geslaagde penetratie van de celwand fenolische componenten accumuleerden, werd dit niet meegerekend. Accumulatie van fenolische componenten wordt vaak beschreven in associatie met papillae vorming, en dat valt in deze context dus niet onder productie hiervan op celniveau. Enkele representatieve microscopische foto's van de verschillende klassen worden weergegeven in figuur 14.



Figuur 14 – Microscopische foto's van de verschillende klassen van accumulatie van fenolische componenten. (a) Geen accumulatie van fenolische componenten. (b) Accumulatie van fenolische componenten in een deel van de cel. (c) Accumulatie van fenolische componenten in een deel van de cel en in de aangrenzende cel.

Opnieuw werden 4 tijdstippen gescourd (12 – 24 – 48 – 72 hai). De resultaten van 72 hai zijn terug te vinden in figuur 15. Bij 12 hai vond bij nog geen enkele interactie accumulatie van fenolische componenten plaats. Op 24 hai was dit wel het geval bij elk van de 4 interacties en dit in gelijkaardige hoeveelheden; 10 tot 20% toonde in een deel van de cel accumulatie van fenolen en \pm 5% in de hele cel. Op 48 hai werd er bij de incompatibele interacties al duidelijk meer accumulatie van fenolen waargenomen dan bij de compatibele interacties. De interactie van *f. sp. tritici* op triticale leidde bij 50% van de conidia tot accumulatie van fenolen in de volledige cel, en bij 30% in een deel van de cel. De interactie van het *triticale* isolaat op tarwe vertoonde bij 40% van de conidia accumulatie van fenolen in een deel van de cel, en bij 20% in de hele cel.

Zoals te zien in figuur 15, vertoonden op 72 hai beide incompatibele interacties de meeste accumulatie van fenolen in een deel van de cel (45%) en in de volledige cel (35%) . Het is duidelijk dat de compatibele reacties minder leiden tot accumulatie van fenolen, hoewel er ook bij deze reacties merkwaardig veel fenolen geproduceerd werden. De som in tabel 6 illustreert dit duidelijk.



Figuur 15 – Accumulatie van fenolische componenten bij *B. graminis f. sp. tritici* en *B. graminis triticales* op 72 hai. De data zijn gemiddelden en standaard deviatie van 3 herhalingen met telkens 50 interacties per blad. Verschillende letters geven voor elke klasse afzonderlijk statistisch significante verschillen aan tussen de verschillende interacties.

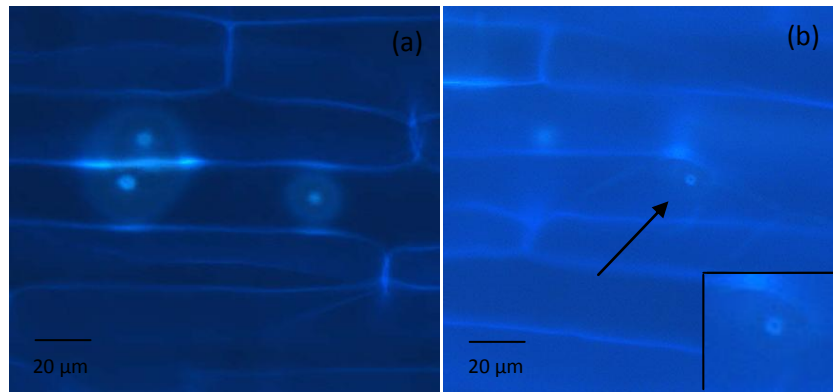
Tabel 6 – Percentage interacties met accumulatie van fenolen. De data zijn gemiddelden en standaard deviatie van 3 herhalingen met telkens 50 interacties per blad.

	Bgt - Tarwe	Bgt - Triticale	BgTR - Tarwe	BgTR - Triticale
Som fenolen				
=(Fenolen in deel van cel) + (Fenolen in hele cel) + (Fenolen in hele cel en aangr. cel)				
12 hai	0 ± 0	2 ± 2	0,67 ± 1,16	1,33 ± 2,31
24 hai	24,67 ± 9,24	18 ± 5,30	22,67 ± 9,87	12,67 ± 5,03
48 hai	37,33 ± 6,43	77,33 ± 6,11	58,67 ± 11,01	38,83 ± 6,79
72 hai	49,33 ± 5,03	80,67 ± 6,11	74 ± 7,21	40,33 ± 2,89

Uit tabel 6 blijkt duidelijk dat de twee incompatibele interacties meer productie van fenolen (81 en 74%) teweeg brachten dan de compatibele reacties (49 en 40%) bij 72 hai.

4.3.4 Histochemische kleuring van callose

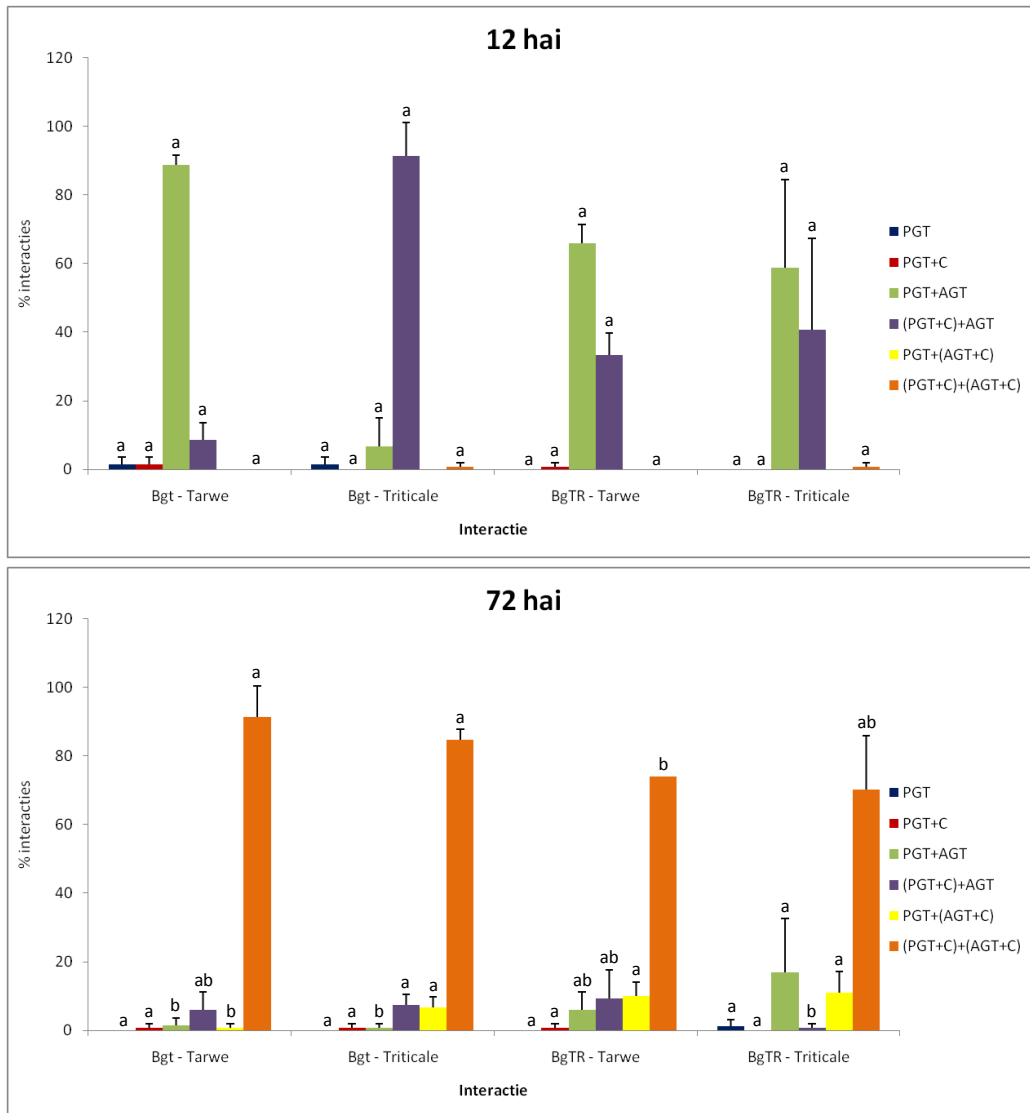
Voor het scoren van callose vorming geassocieerd met papillae werden 7 verschillende klassen onderscheiden. De nulscore was opnieuw geen kieming, de 6 andere klassen waren: PGT, PGT+C, PGT+AGT, (PGT+C)+AGT, PGT+(AGT+C) en ten slotte (PGT+C)+(AGT+C), naar analogie met de scores van lokale H₂O₂ productie. Enkele relevante microscopische foto's van de verschillende klassen zijn te vinden in figuur 16. Er is een duidelijk onderscheid tussen de callose bij incompatibele en compatibele reacties, bij de eerste is de calloseprop nog intact (figuur 16a), terwijl bij de tweede de infectiepin door de calloseprop is heen gegroeid is en deze nu de vorm van een ring heeft (figuur 16b).



Figuur 16 – Microscopische foto's van de productie van callose geassocieerd met papillae bij een compatibele en incompatibele reactie. (a) Callose bij incompatibele reactie: (PGT+C) + (AGT+C). Het appressorium heeft een 2e lobe aangelegd. (b) Callose bij compatibele reactie: (PGT+C) + (AGT+C). Hier is een callose-ring zichtbaar (pijl).

Er werden opnieuw 4 tijdstippen gescoord (12 – 24 – 48 – 72 hai). De resultaten op 12 en 72 hai worden weergegeven in figuur 17. Bij 12 hai hadden alle interacties, inclusief het triticale isolaat op triticale, reeds een AGT gevormd. Dit strookt op het eerste zicht niet met bevindingen uit de vorige protocols. Bij de sterk incompatibele interactie van *f. sp. tritici* op triticale, was er sterke reactie op de PGT met callose vorming bij 90% van de conidia. Tegen 24 hai was er bij de helft van de conidia ook callose vorming bij de AGT, terwijl de andere helft dit nog niet had en de callose bij de PGT tevens minder zichtbaar werd. Het triticale isolaat leidde op 12 hai op beide gastheren tot vorming van callose als reactie op de PGT in ongeveer 40% van de conidia. Tegen 24 hai was er bij beide interacties ook callose productie bij de AGT, en dit het sterkst bij het triticale isolaat op triticale ($\pm 60\%$). Ook *f. sp. tritici* op tarwe bracht veel callose productie als respons op vorming van de AGT teweeg ($\pm 65\%$). Tegen 48 hai had elk van de 4 interacties globaal gezien een gelijkaardig hoeveelheid aan callose vorming geïnduceerd en dit beeld bleef hetzelfde op 72 hai. Enkel het triticale isolaat op triticale leek vroeger bij alle AGT callose productie te hebben geïnduceerd (85% tegenover 60-70% bij de andere interacties en dit al op 48 hai), waardoor het ook vroeger weer leek te vervagen (vermindering tot 70% bij 72 hai)

Er was echter een duidelijk verschil tussen compatibele en incompatibele reacties: bij de interactie *f. sp. tritici* op triticale waren alle calloseproppen nog intact. Bij de 3 andere interacties waren progressief meer doorgroeide callose proppen, de callose-ringen, te bemerken.



Figuur 17 – Productie van callose bij *B. graminis* f. sp. *tritici* en *B. graminis* triticales. Grafische weergave van de 4 interacties bij 12 en 72 hai. De data zijn gemiddelden en standaard deviatie van 3 herhalingen met telkens 50 interacties per blad. Verschillende letters geven voor elke klasse afzonderlijk statistisch significante verschillen aan tussen de verschillende interacties.

5 Discussie

5.1 Virulentietesten

5.1.1 Virulentietesten en virulentiebomen

De lage bootstrap waarden van de clusters in de virulentiebomen verhinderen de extrapolatie van deze conclusies naar de hele populatie. Overkoepelend onderzoek vertoont echter gelijkaardige resultaten (Troch, nog niet gepubliceerde data). De *f. sp. tritici* isolaten vertonen over het algemeen een ander infectiepatroon dan de *triticales* isolaten. *B. g. f. sp. tritici* is virulent op verschillende tarwe cultivars met gekende *Pm* genen, maar nooit op de gevoelige *triticales*. De *triticales* isolaten kunnen zowel de *triticales* cultivars als de meeste tarwe cultivars infecteren. Geen enkel isolaat is virulent op de rogge cultivar.

De *f. sp. tritici* isolaten uit België zijn over het algemeen meer virulent dan de isolaten uit Israël. De isolaten uit Israël dateren van de jaren '80 en worden in een schimmelbank bijgehouden. De populatie kon geen mutatie ondergaan waardoor avirulentie-allelen tegen de courante *Pm* genen mogelijk beter bewaard bleven bij deze isolaten. Uit de data kunnen geen geografische conclusies getrokken worden: de 3 meest virulente *triticales* isolaten komen respectievelijk uit Polen, Frankrijk en België. Polen is echter wel het land met het grootste *triticales* areaal ter wereld, waardoor nauw contact met de schimmel populatie kon optreden, wat dan weer tot verhoogde frequentie van mutaties kan leiden.

Wanneer deze resultaten vergeleken worden met deze van Walker et al. (2011), dan luiden dezelfde conclusies. De *triticales* isolaten zijn vaak in staat tarwe te infecteren, en in hun onderzoek was dit ook sporadisch het geval op rogge. Ze onderzochten ook verschillende *formae speciales* van *B. graminis* en vonden dat enkel de *triticales* isolaten er in slaagden om *triticales* substantieel te infecteren.

Er werd eerder reeds beschreven dat host restrictie niet overal ter wereld even strikt is. Zo heeft in het Midden-Oosten *f. sp. tritici* een vrij breed gastheer spectrum, wat het adaptatie vermogen van deze *forma specialis* illustreert. Het is daarom denkbaar dat deze over de loop van vele generaties een gastheer-expansie heeft ondergaan. Met een voldoende hoge ziektedruk (over een groot areaal en over voldoende lange tijd) kan de non-host resistentie van *triticales* ten opzichte van *f. sp. tritici* doorbroken zijn. Non-host resistentie wordt, zoals uitgelegd in de literatuurstudie, overwonnen door effectoren (virulentiefactoren). Het overkomen van rasspecifieke resistentie werd door McDonald en Linde (2002) via een 'boom and bust' cyclus beschreven. Natuurlijke mutaties in avirulentie allelen leiden tot weggevalen *R-avr* eiwit herkenning en eventueel nieuwe virulentiefactoren. Selectie op populatieniveau leidt dan tot het doorbreken van de resistentie van dit *Pm* gen.

Het virulentiepatroon van de *triticales* isolaten en het adaptatievermogen van de *f. sp. tritici* isolaten zijn sterke indicaties in de richting van een gastheerexpansie, maar ze sluiten de alternatieve hypothese van een hybridisatie tussen *f. sp. tritici* en *f. sp. secalis* niet uit. Er is echter nog een argument voor gastheer-expansie dat nog niet werd aangehaald, dit is geografisch namelijk de meer logische verklaring. Een hybridisatie zou substantiële oppervlaktes aan tarwe en rogge vereisen, die dan nog eens vrij dicht van elkaar moeten liggen. Enkele cijfers van het FAO illustreren dat dit niet de situatie was in de periode dat *triticales* gevoelig werd voor meeldauw (richtjaar 2001). Wanneer de cijfers voor België, Nederland en Frankrijk bijvoorbeeld samen geteld worden, werd er in 2001

slechts 32795 ha rogge geteeld, tegenover 5072360 ha tarwe en 251176 ha triticale. Dit toont aan dat de omstandigheden voor hybridisatie niet optimaal waren.

De onderzochte triticale isolaten konden niet onderling gediscrimineerd worden op de triticale cultivars. Dit bevestigt dat de genetische basis van de huidige courante triticale cultivars vrij nauw is, en dat hun *Pm* genen waarschijnlijk grotendeels dezelfde zijn; dit blijkt ook uit de postulatie van resistentiegenen. De triticale isolaten konden wel gediscrimineerd worden op de differentiële tarwe cultivars. Dit toont aan dat er nog een toekomst is voor selectie van resistentie in de bestaande tarwe cultivars. Er worden echter nog altijd nieuwe *Pm* genen ontdekt in vooral wilde grassoorten, die vrij eenvoudig in tarwe en triticale in te kruisen zijn (Hsam en Zeller, 2002; Huang en Röder, 2004).

De verzamelde isolaten vertonen op tarwe een vrij divers virulentiespectrum, een gegeven dat wellicht wel extrapoleerbaar is naar de volledige populatie *B. graminis*. Dit geeft aan dat aanwezige virulentie allelen geografisch sterk kunnen verschillen: lokale cultivarkeuze kan via het 'boom and bust' mechanisme vlug leiden tot een verandering in de pathogeen populatie.

Parks et al. (2008) vonden dat grote geografische afstanden tussen de isolaten leidden tot meer verschillende virulentiefenotypes. De triticale isolaten in figuur 8b clusteren matig samen per locatie, maar lage bootstrap waarden en de samenclustering van onder andere BgTR4 België met de Franse isolaten verhindert hier gelijkaardige conclusies.

5.1.2 Virulentiefrequenties

Wanneer een compatibele reactie gezien wordt als een mutatie in het corresponderende avirulentie allel van elk isolaat in kwestie, dan geven de virulentiefrequenties weer op welke loci de meeste mutaties plaatsvonden in de pathogeen populatie. Dit is vaak verklaarbaar door een frequenter gebruik van de cultivars die het overeenkomstige *Pm* gen voor deze locus bevatten. Zo worden *Pm2*, *Pm5a*, *Pm5b*, *Pm6* en *Pm8* door Hsam en Zeller (2002) geciteerd als vaak voorkomend en gebruikt in Europese tarwe cultivars. Volgens Lillemo et al. (2010) worden daarnaast in Scandinavische landen ook vaak *Pm3d*, *Pm3f* en *Pm3b* gebruikt. Dit kan een deel van de virulentiefrequenties van zowel de tarwe als de triticale isolaten verklaren, maar niet alle.

De hoogste virulenties van de *f. sp. tritici* isolaten werd bemerkt tegenover cultivars met *Pm3d*, *Pm3f*, *Pm5a*, *Pm5b*, *Pm6* en *Pm7* (> 80%). Courant gebruik van de overeenkomstige cultivars kan hier de verklaring voor de hoge virulentiefrequenties zijn, uitgezonderd voor *Pm7*. Gelijkaardige zeer hoge virulentiefrequenties werden voor *Pm5a*, *Pm5b* en *Pm6* reeds gerapporteerd door Svec en Miklovicova (1998) voor Centraal-Europa. *Pm4b* dat volgens hen sterk aan regionale verschillen gebonden is, biedt hier resistentie in ongeveer de helft van de gevallen. Uit hetzelfde onderzoek bleek dat *Pm3b*, *Pm2+mld* en *Pm1+2+9* nog vrij goede resistentie verschaften tegen *f. sp. tritici*. Dit wordt ook bevestigd in deze resultaten.

Triticale isolaten in deze thesis infecteerden vooral de cultivars met *Pm5b*, *Pm6*, *Pm7*, *Pm8* en *Pm17* (> 40%). *Pm7*, *Pm8* en *Pm17* zijn *Pm* genen oorspronkelijk afkomstig uit het rogge genoom. Het is mogelijk dat deze bij het ontstaan van triticale meegekruist werden in het triticale genoom en zo lange tijd in gebruik waren/zijn. Op deze manier zou ook deze hoge virulentie verklaard kunnen worden. Huidige kennis over aanwezigheid en gebruik van *Pm7* en *Pm17* in tarwe en triticale cultivars is hier nog niet toereikend om een antwoord te bieden.

5.2 Postulatie van *Pm* genen in triticale

De postulatie methode steunt op een proces van eliminatie van *Pm* genen in de triticale cultivars op basis van compatibele interacties met de *triticales* isolaten. Aangezien geen enkel isolaat Cultivo kan infecteren, kunnen voor deze cultivar geen *Pm* genen geëlimineerd worden. Het is dus goed mogelijk dat Cultivo één of meerdere van de geteste *Pm* genen bevat. Voor de andere 8 triticale cultivars konden alle *Pm* genen buiten *Pm6* en *Pm8* geëlimineerd worden. De lijst van gebruikte *Pm* genen in deze thesis omvat nagenoeg alle courante *Pm* genen en –combinaties in tarwe, waardoor de aanwezigheid van *Pm6* en *Pm8* in deze cultivars waarschijnlijk is.

Pm6 was volgens Bennett (1984) het meest gebruikte *Pm* gen ter wereld in de tarweveredeling. Volgens Hsam en Zeller (2002) is ook *Pm8* een wereldwijd gebruikt *Pm* gen in tarwe cultivars. Alhoewel de stamboom van de gebruikte triticale cultivars niet gekend is, is het toch denkbaar dat (één van) de voorouders ervan deze *Pm* genen dus bevatte. Voor *Pm6* bestaat nog geen moleculaire merker, maar voor de 1B/1R translocatie die typisch is voor *Pm8* wel, en zo kan de aanwezigheid van *Pm8* bevestigd worden. Walker et al. (2011) vonden dat het cumulatief triticale areaal vanaf de start van de cultivatie tot het doorbreken van de resistentie, even groot was als dat van tarwe cultivar Clément (*Pm8*) tot wanneer deze resistentie doorbroken werd. Dit kan eveneens een indicatie zijn voor de aanwezigheid van *Pm8* in veel van de courante triticale cultivars.

Veel cultivars die in deze thesis gebruikt werden, worden in de praktijk door de kwekers aangeprijsd als (zeer) resistent tegen meeldauw. Gezien alle triticale cultivars buiten Cultivo geïnfecteerd kunnen worden door alle *triticales* isolaten, zou men hier een tegenstrijdigheid in kunnen vinden. Het moet echter vermeld worden dat *Pm6* codeert voor resistentie die meest uitgesproken is in het volwassen stadium van de plant (Hsam en Zeller, 2002). Met dergelijke resistentie werd in deze thesis geen rekening gehouden doordat virulentietesten op zaailingen uitgevoerd werden.

5.3 Microscopisch onderzoek

5.3.1 Ontwikkeling van meeldauw

Uit de literatuur blijkt dat de vorming van de PGT bij *B. graminis* reeds 30 minuten na inoculatie kan starten. Het vroegste tijdstip dat in het teken van ontwikkeling van meeldauw werd onderzocht, is 6 hai. Bij elk van de 4 interacties waren hier inderdaad voor alle conidia de PGTs gevormd. De AGT zou gevormd worden vanaf 4 hai. Hier wijkt één interactie af van het verwachte: het triticale isolaat op de triticale cultivar heeft bij 8 hai in 50% van de conidia nog geen AGT gevormd. Dit blijkt typisch te zijn voor deze interactie, aangezien het niet voorkomt bij *f. sp. tritici* op triticale (niet cultivar afhankelijk), noch bij *triticales* op tarwe (niet isolaat afhankelijk). Op 8 hai heeft ook bij deze interactie AGT vorming quasi volledig plaatsgevonden.

Voor het globale infectieproces heeft deze ‘vertraging’ van infectie geen effect. Triticale isolaten starten namelijk vroeger (merkbaar vanaf 24 hai: hoger gehalte aan appressoriale lobes) aan de kolonisatie van hun gastheer. Dit is wel isolaat-afhankelijk, aangezien het plaatsvindt op zowel tarwe als triticale. De interactie van het *triticales* isolaat op triticale lijdt onder een grote standaard deviatie, doch gezien dit resultaat geldig was op 2 van de 3 herhalingen, is deze vaststelling geldig. Tegen 72 hai heeft ook *f. sp. tritici* op tarwe een succesvolle infectie en kolonisatie teweeg gebracht. Het is opmerkelijk dat het triticale isolaat op tarwe zich niet laat onderscheiden van de 2 volledig compatibele reacties op vlak van de vorming van het haustorium en secundaire hyfen. Zoals figuur 9 illustreert, is er macroscopisch wel een duidelijk verschil tussen deze reacties. Dit betekent dat

verdedigingsmechanismen van deze tarwe om penetratie en infectie te voorkomen (vorming van papillae en fenolen, lokale H₂O₂ productie) bij deze interactie weliswaar uitgevoerd worden, maar succesvol overwonnen worden door *B. graminis triticales*. De schimmel heeft zich hier geïmplementeerd om pre-invasie resistentie van de tarweplant te overkomen. Wanneer even teruggedacht wordt aan de hypothese dat de triticales isolaten eigenlijk geëvolueerde *f. sp. tritici* isolaten zijn, is het inderdaad denkbaar dat deze in staat zijn de pre-invasie resistentie te overwinnen.

Gezien er na 2 weken toch verminderde myceliumvorming en sporulatie is, zoals macroscopisch te zien (figuur 9), moet er van uit gegaan worden dat de verdediging van deze tarwe cultivar tegen het triticales isolaat kan steunen op een post-haustoriale afweer. Specifieke mechanismen hierachter werden voor het eerst door Wang et al. (2009) beschreven. Ze vonden dat haustorium aanleg door meeldauw bij *Arabidopsis* leidde tot een verhoogde expressie van het R-eiwit RPW8.2. De plant is in staat dit resistentie eiwit specifiek naar de extrahaustoriale membraan te transporteren, waar het dan in staat is voor post-invasie resistentie. Deze resistentie omvat het inkapselen van het haustorium door callose en de hypersensitieve respons. Deze reactie vindt niet plaats bij de compatibele interacties. Verder onderzoek, bijvoorbeeld door histochemische kleuring op latere tijdstippen dan 72 hai, kan hier uitwijzen of tarwe hetzelfde mechanisme als *Arabidopsis* aanneemt.

5.3.2 Non-host verdedigingsmechanismen van de plant

Het onderzoek naar verdedigingsmechanismen van de plant deelt zich hier op in twee delen. Enerzijds werd de non-host verdediging tegen penetratie door middel van lokale papillae en lokale H₂O₂ vorming onderzocht, anderzijds werd ook de rassen-specifieke resistentie door inductie van HR bekeken. Papillae vorming is lokaal ook geassocieerd met fenolproductie, er werd in dit onderzoek echter alleen fenolproductie op celniveau onderzocht als mechanisme van de non-host resistentie.

Verdedigingsmechanismen van de plant worden niet uitgelokt door PGT of AGT vorming, maar door respectievelijk de vorming van de cuticulare pin en de infectiepin uit de tip van voornoemde structuren. De cuticulare pin verschijnt volgens de literatuur vanaf 3 hai, terwijl de infectiepin vanaf 12 hai gevormd wordt, en dit volgend op het opzwellen van de AGT tot een appressorium (10 hai). In de tekst die volgt zal toch regelmatig gesproken worden van afweer ten gevolge van PGT en AGT vorming.

Reactie op de cuticulare pin (PGT) verschilde sterk tussen de verschillende reacties. De volledig incompatibele reactie van *f. sp. tritici* op triticales heeft bij 12 hai een sterke callose reactie op de PGT. Ervan uitgaand dat de cuticulare pin al van 3 hai kan ontstaan, kan dit ofwel een late reactie zijn, ofwel blijkt callose in tegenstelling tot H₂O₂ een stof te zijn die met de tijd niet of minder vervaagt. Gezien ook nog op latere tijdstippen callose merkbaar is ter hoogte van de PGT, wordt van de tweede mogelijkheid uitgegaan. Op de latere tijdstippen werd ook duidelijk dat elk van de 4 reacties callose ten gevolge van de infectiepin vormt. Dit strookt met de opvatting dat elke pathogeen een non-host resistentie van de plant uitlokt en moet overwinnen. Ervan uitgaande dat de infectiepin pas gevormd wordt rond 12 hai, is het logisch dat er nog geen callose bij de AGT wordt bemerkt op dit tijdstip.

Deze callose ter hoogte van de AGT wordt volgens de data eerst gevormd bij de compatibele reacties van *f. sp. tritici* op tarwe en het triticales isolaat op triticales (24 hai), en tegen 48 hai hebben ook de incompatibele reacties callose-vorming geïnduceerd bij veel van de conidia. Deze snelheid van callose aanleg blijkt dus noch isolaat, noch gastheer afhankelijk te zijn. Wanneer nu de data over

ontwikkeling van meeldauw worden vergeleken met de data over productie van callose, blijkt dat 3 van de 4 reacties erin zullen slagen deze non-host resistentie te overkomen, of met andere woorden dat de infectiepin de calloseprop zal doorgroeien (figuur 16b). Hierbij valt de hogere infectiesnelheid op te merken van het triticaal isolaat in vergelijking met het tarwe isolaat.

De interactie *f. sp. tritici* op tarwe krijgt relatief bekeken vrij vroeg in de ontwikkeling te maken met callose productie ter hoogte van de AGT, en het doorgroeien hiervan duurt relatief gezien het langst. De interacties met het triticaal isolaat doorgroeien de callose het vlugst, en deze komt in geval van het *triticaal* isolaat op tarwe ook relatief het laatst tevoorschijn. De volledig incompatibele interactie ten slotte doorgroeit de calloseprop quasi niet. Er is hier dus sprake van efficiënte non-host resistentie. Met het gebruikte scoresysteem was het jammer genoeg niet mogelijk te kwantificeren hoeveel van de papillae per interactie doorgroeid werden.

Nu duidelijk geïllustreerd is dat callose vorming een proces is dat bij alle interacties optreedt, is het interessant om te kijken of dit ook geldt voor lokale H_2O_2 vorming en productie van fenolische componenten. Finaal zal dan bekeken worden hoe deze al dan niet succesvolle non-host resistentie relateert tot het induceren van een HR.

Los van de verder besproken H_2O_2 vorming bij HR op celniveau, wordt H_2O_2 ook lokaal geproduceerd, vaak geassocieerd met de papillae. Li et al. (2005) vonden bij tarwe geen verschil tussen compatibele en incompatibele interacties op vlak van lokale H_2O_2 productie ten gevolge van PGT en AGT. Bij de PGT vonden ze dat tegen 20 hai het H_2O_2 niveau alweer daalde, terwijl dit voor de AGT nog niet het geval was. Uit de data blijkt eerst en vooral dat lokale H_2O_2 productie bij deze interacties laag ligt (maximaal $\pm 35\%$). Binnen deze lage grenzen blijkt echter dat de interacties met de triticaal isolaten iets vlugger H_2O_2 bij de AGT teweeg brengen (bij 24 hai $\pm 20\%$). Dit strookt met het gegeven dat ze vlugger aan infectie en kolonisatie doen. Er werd echter eerder reeds vastgesteld dat bij 24 hai het *triticaal* isolaat op triticaal meer papillae vorming had dan het *triticaal* isolaat op tarwe. Hieruit kan dus blijken dat de 'incompatibele' reactie relatief gezien meer lokale H_2O_2 productie geassocieerd met papillae heeft dan de compatibele reactie.

Er werd reeds vermeld dat de compatibele interactie van *f. sp. tritici* op tarwe reeds bij 24 hai vrij veel papillae heeft gevormd (60%). Bij dit tijdstip is echter nog haast geen lokale H_2O_2 vorming te bemerken. Infectie en kolonisatie is bij deze interactie ook trager dan bij de triticaal isolaten. Globaal blijkt dus dat callose vorming en lokale H_2O_2 productie hier mogelijk geen volledig gekoppelde processen zijn. Callose vorming gebeurt dan als reactie op contact met infectiepin in associatie met papillae aanleg. Lokale H_2O_2 productie daarentegen is meer geassocieerd met het later infecteren en koloniseren van de plantencel: ze komt eerst voor bij de triticaal isolaten. Infectie volgt hier ook vlugger op papillae aanleg. Dit kan een andere reden zijn voor de relatief meer lokale H_2O_2 vorming bij 24 hai ten opzichte van de hoeveelheid papillae bij de interactie van het *triticaal* isolaat op tarwe t.o.v. het *triticaal* isolaat op triticaal.

Het blijkt uit de data dat de accumulatie van fenolen op celniveau een proces is dat niet exclusief voorkomt bij de incompatibele reacties: het komt net als callose vorming voor bij elk van de 4 interacties. Er is echter wel een duidelijk verschil tussen accumulatie van fenolen bij compatibele en incompatibele interacties. Bij de volledig incompatibele reactie van *f. sp. tritici* op triticaal is er ook sneller accumulatie van fenolen. Er kan echter besloten worden dat dit defensiemechanisme hier niet doorslaggevend is, en om dit in te zien moeten enkel de reacties met het triticaal isolaat

bekeken worden. De reactie van dit isolaat op tarwe lokte significant meer accumulatie van fenolische componenten uit dan de reactie op triticale, maar toch slaagden beide reacties erin een even snelle en relatief vroege infectie en kolonisatie van de gastheer te bewerkstelligen, zoals eerder werd aangetoond. Mogelijk is accumulatie van fenolen bij de interactie van het *triticales* isolaat op tarwe niet snel genoeg, de interactie van *f. sp. tritici* op triticale lokt deze accumulatie bij 48hai namelijk reeds in hogere mate uit.

5.3.3 Hypersensitieve respons

Er is voor de HR, of anders gezegd de rassen specifieke resistentie, geen erg belangrijke rol weggelegd in dit microscopisch onderzoek. De volledig incompatibele reactie van *f. sp. tritici* op triticale wordt grotendeels verklaard door non-host resistentie via efficiënte papillae vorming, en de reactie van het *triticales* isolaat op tarwe gedraagt zich microscopisch tot en met 72 hai als een compatibele reactie. Het is echter toch interessant te kijken welke reacties een bescheiden percentage aan HR induceren en hoe dit verklaard kan worden.

De tarwe cultivar Holger bevat als enige resistentiegen *Pm6*, en de triticale cultivar Lamberto bevat volgens de postulatie van resistentiegenen ook dit gen. Ze komen echter voor in twee verschillende genetische achtergronden en dit kan leiden tot verschillende reacties. De twee 'incompatibele' reacties induceren volgens de data ongeveer evenveel HR (15-20% bij 72 hai). Wanneer vergeleken wordt met de literatuur blijkt opnieuw dat dit een lage en late reactie is. HR moet hier gezien worden als de volgende stap in verdediging van de plant, wanneer papillae vorming niet slaagde. Li et al. (2005) vonden dan ook dat efficiënte papillae en hypersensitieve respons nooit in dezelfde cel voorkwamen. Wanneer dus in rekening wordt gebracht dat bij de interactie van *f. sp. tritici* op triticale veel minder conidia erin slagen de papilla en celwand te doordringen, lijkt het alsof *Pm6* in de genetische achtergrond van triticale tot relatief meer HR leidt.

In ieder geval was de HR reactie in beide gevallen eerder licht, zoals blijkt uit de zwakke DAB kleuring van de cellen. Li et al. (2005) gebruikten echter ook een cultivar met enkel *Pm6* als resistentiegen en merkten wel sterke HR op, wat de invloed van verschillende genetische achtergronden aantoont. Het kan interessant zijn om in verder onderzoek een interactie te gebruiken waarbij zeker sterke HR optreedt. Zo kan bijvoorbeeld van een *triticales* isolaat gekwantificeerd worden hoeveel conidia in hun ontwikkeling gestopt worden door de initiële hypersensitieve respons, en dan op een later tijdstip hoeveel door de post-haustoriale resistentie. Van deze laatste toonden Wen et al. (2011) aan dat ze ook een hypersensitieve respons omvat.

Het voorkomen van HR bij de interactie van *f. sp. tritici* op triticale toont ook aan dat haustorium aanleg niet noodzakelijk is voor inductie van HR. Deze interactie slaagt er namelijk slechts in $\pm 3\%$ van de gevallen in een haustorium aan te leggen, terwijl HR $\pm 20\%$ bedraagt (doch met een vrij grote standaarddeviatie). HR bij de compatibele reacties komt nagenoeg niet voor (tabel 5). Li et al. (2005) vonden ook bij hun compatibele interacties HR niveaus lager dan 10%.

6 Conclusie

De pathologische studie van meeldauw op zijn 'nieuwe' gastheer triticale verschaft uiteindelijk enkele indicaties ten voordele van de hypothese dat er een gastheer-expansie van de *f. sp. tritici* van tarwe naar triticale cultivars heeft plaatsgevonden. Ten eerste is de nieuwe infectievorm nog in staat verschillende tarwe cultivars te infecteren, wat denkbaar is voor meeldauw oorspronkelijk afkomstig van tarwe. Ook staat het vast dat *f. sp. tritici* een groot adaptatie vermogen heeft. Sterke argumenten tegen deze hypothese werden nog niet gevonden, terwijl deze wel beschikbaar zijn voor de hypothese dat er een hybridisatie tussen *f. sp. tritici* en *f. sp. secalis* heeft plaatsgevonden. Zo waren de geografische regio's waar tarwe en rogge werden geteeld op het moment dat de resistentie van triticale doorbroken werd niet optimaal voor een mogelijke hybridisatie, en zijn de triticale isolaten niet in staat om rogge te infecteren. Dit is echter geen vereiste voor een hybride, dus kan op deze basis de theorie nog niet volledig uitgesloten worden. Anderzijds kan ook de theorie van gastheer-expansie nog niet onomwonden bevestigd worden.

De thesis verschaft ook een deel validatie naar de veredeling toe. Postulatie van resistentiegenen duidt *Pm6* en *Pm8* aan als *Pm* genen mogelijk aanwezig in de onderzochte triticale cultivars. Gericht genetisch onderzoek met moleculaire merkers moet dit nu verder bevestigen. Dit toont de geringe genetische variabiliteit van de commerciële triticales aan, wat betreft de resistentie tegen meeldauw. Ook worden enkele genen(combinaties) aangeduid die nog volledige resistentie verschaffen tegen de 'nieuwe' triticale isolaten. Dit is waardevolle informatie voor de triticale-veredeling.

Voor het eerst werd het infectieproces van de 'nieuwe' *B. graminis* isolaten van op triticale microscopisch onderzocht. Er werd vastgesteld dat deze in vergelijking met *f. sp. tritici* isolaten vlugger aan infectie en kolonisatie beginnen. Alle interacties krijgen te maken met dezelfde afweermechanismen op celniveau als onderdelen van de non-host resistentie, zoals lokale H₂O₂ productie en papillae aanleg, en fenolproductie. Bepaalde interacties (*f. sp. tritici* op tarwe; triticale isolaat op triticale; triticale isolaat op tarwe) zullen deze echter succesvol overwinnen en in staat zijn infectie en kolonisatie uit te voeren. De data suggereren dat lokale H₂O₂ productie niet volledig gekoppeld is aan papillae aanleg, maar eerder geassocieerd zou zijn met het overwinnen van de non-host resistentie en verdere infectie en haustorium aanleg. Uit de resultaten blijkt eveneens duidelijk dat de interactie van een triticale isolaat op tarwe steunt op een post-haustoriale resistentie. Het kan dus interessant zijn om cytologische kleuringen uit te voeren later dan 72 hai om dit te onderzoeken.

Referenties

- Ammar, K., Mergoum, M., Rajaram, S. (2004) The history and evolution of triticale. In: Mergoum, M., Gómez-Macpherson, H. (eds.), FAO plant production and protection paper 179: Triticale improvement and production, 1-10
- Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K., Schulze-Lefert, P. (2002) The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. *Science*, 295, 2073-2076
- Bennett, F. (1984) Resistance to powdery mildew in wheat: a review of its use in agriculture and breeding programmes. *Plant Pathology*, 33, 279-300
- Bhullar, NK., Zhang, ZQ., Wicker, T., Keller, B. (2010) Wheat gene bank accessions as a source of new alleles of the powdery mildew resistance gene *Pm3*: a large scale allele mining project. *BMC Plant Biology*, 10, 88
- Brown, JKM., Wolfe, MS. (1990) Structure and evolution of a population of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Plant Pathology*, 39, 376-390
- Carver, TLW., Kunoh, H., Thomas, BJ., Nicholson, RL. (1999) Release and visualization of the extracellular matrix of conidia of *Blumeria graminis*. *Mycological Research*, 103, 547-560
- Czembor, JH. (2001) Sources of resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) in Moroccan barley land races. *Canadian Journal of Pathology*, 23, 260-269
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., Lamb, C. (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences in the United States of America*, 98, 13454-13459
- Domeradzka, O., Czembor, H. J. (2009) Pathogenicity of powdery mildew (*Blumeria graminis* (DC.)Speer) on triticale (x *Triticosecale* Wittm.) in Poland. In: 12th International Cereal Rusts and Powdery Mildews Conference, Antalya, Turkey, abstract book p130
- Edwards, HH. (2002) Development of primary germ tubes by conidia of *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* on leaf epidermal cells of *Hordeum vulgare*. *Canadian Journal of Botany*, 80, 1121-1125
- Elliott, C., Zhou, FS., Spielmeier, W., Panstruga, R., Schulze-Lefert, P. (2002) Functional conservation of wheat and rice Mlo orthologs in defense modulation to the powdery mildew fungus. *Plant-Microbe Interactions*, 15, 1069-1077
- FAO, FAOSTAT (2010) <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (gelezen op 23 maart 2011)
- Feng, J., Wang, F., Hughes, GR., Kaminskyj, S., Wei, YD. (2011) An important role for secreted esterase in disease establishment of the wheat powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*. *Canadian Journal of Microbiology*, 57, 211-216
- Flor, HH. (1955) Host-parasite interaction in flax rust – its genetics and other implications. *Phytopathology*, 45, 680-685

- Freialdenhoven, A., Peterhänsel, C., Kurth, J., Kreuzaler, F., Schulze-Lefert, P. (1996) Identification of genes required for the function of non-race-specific *mlo* resistance to powdery mildew in barley. *The Plant Cell*, 8, 5-14
- Freialdenhoven, A., Scherag, B., Hollricher, K., Collinge, DB., Thordal-Christensen, H., Schulze-Lefert, P. (1994) Nar-1 and Nar-2, two loci required for *Mla*₁₂-specified race-specific resistance to powdery mildew in barley. *The Plant Cell*, 6, 983-994
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., Pugin, A. (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19, 711-724
- Glawe, A. (2008) The powdery mildews: a review of the world's most familiar (yet poorly known) plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 46, 27-51
- Glazebrook, J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 205-207
- Greenberg, JT. (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology*, 6, 201-211
- Haesaert, G., Derycke, V., Latré, J., Heremans, B. (2006) Evolution of disease pressure on triticale under Belgian growing conditions: overview of the last 20 years. In: *Proceedings of the 6th International Triticale Symposium, Stellenbosch, South-Africa*
- He, RL., Chang, ZJ., Zang, ZJ., Yuan, ZY., Zhan, HX, Zhang, XJ., Liu, JX. (2009) Inheritance and mapping of powdery mildew resistance gene *Pm43* introgressed from *Thinopyrum intermedium* into wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 118, 1173-1180
- Heath, MC. (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology*, 44, 321-334
- Hood, ME., Shew, HD. (1996) Applications of KOH-aniline blue fluorescence in the study of plant-fungal interactions. *Phytopathology*, 86, 704-708
- Hsam, SLK., Zeller, FJ. (1997) Evidence of allelism between genes *Pm8* and *Pm17* and chromosomal location of powdery mildew and leaf rust resistance genes in the common wheat cultivar 'Amigo'. *Plant Breeding*, 116, 119-122
- Hsam, SLK., Zeller, FJ. (2002) Breeding for powdery mildew resistance in common wheat (*Triticum aestivum* L.). In: Bélanger, RR., Bushnell, WR., Dik, AJ., Carver, TLW. (eds.), *The powdery mildews: a comprehensive treatise*. St. Paul, Minnesota, American Phytopathological Society, 219-238
- Huang, XQ., Röder, MS. (2004) Molecular mapping of powdery mildew resistance genes in wheat: A review. *Euphytica*, 137, 203-223
- Hückelhoven, R. (2005) Powdery mildew susceptibility and biotrophic infection strategies. *FEMS Microbiology Letters*, 245, 9-17
- Hückelhoven, R. (2007) Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review of Phytopathology*, 45, 101-127

- Hückelhoven, R., Kogel, KH. (2003) Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: Who is who in powdery mildew resistance? *Planta*, 216, 891-902
- Jones, JDG., Dangl, JL. (2006) The plant immune system. *Nature*, 444, 323-329
- Jordan, T., Seeholzer, S., Schwizer, S., Toller, A., Somssich, IE., Keller, B. (2011) The wheat Mla homologue TmMla1 exhibits an evolutionary conserved function against powdery mildew in both wheat and barley. *Plant Journal*, 65, 610-621
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., Shibuya, N. (2006) Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 11086-11091
- Koebner, RMD. (1995) Generation of PCR-based markers for detection of rye chromatin in a wheat background. *Theoretical and Applied Genetics*, 90, 740-745
- Komaromi, J., Vida, G. (2009) Effectiveness of designated major powdery mildew resistance genes in various wheat genotypes. *Cereal Research Communications*, 37, 213-216
- Konishi, S., Sasakuma, T., Sasanuma, T. (2010) Identification of novel Mlo family members in wheat and their genetic characterization. *Genetics & Genetic Systems*, 85, 167-175
- Lan, CX., Ni, XW., Yan, J., Zhang, Y., Xia, XC., Chen, XM., He, ZH. (2010) Quantitative trait loci mapping of adult-plant resistance to powdery mildew in Chinese wheat cultivar Lumai 21. *Molecular Breeding*, 25, 615-622
- Li, AL., Wang, ML., Zhou, RH., Kong, XY., Huo, NX., Wang, WS., Jia, JZ. (2005) Comparative analysis of early H₂O₂ accumulation in compatible and incompatible wheat-powdery mildew interactions. *Plant Pathology*, 54, 308-316
- Linde-Laursen, I., Heslop-Harrison, JS., Shepherd, KW., Taketa, S. (1996) Recommendations for the designation of the barley chromosomes and their arms. *Barley Genetics Newsletter*, 26, 1-4
- Lillemo, M., Asalf, B., Singh, RP., Huerta-Espino, J., Chen, XM., He, ZH., Bjornstad, A. (2008) The adult plant rust resistance loci Lr34/Yr18 and Lr46/Yr29 are important determinants of partial resistance to powdery mildew in bread wheat line Saar. *Theoretical and Applied Genetics*, 116, 1155-1166
- Lillemo, M., Skinnis, H., Brown, JKM. (2010) Race specific resistance to powdery mildew in Scandinavian wheat cultivars, breeding lines and introduced genotypes with partial resistance. *Plant Breeding*, 129, 297-303
- Liu, G., Greenshields, DL., Sammynaiken, R., Hirji, RN., Selvaraj, G., Wei, Y. (2007) Targeted alterations in iron homeostasis underlie plant defense responses. *Journal of Cell Science*, 120, 596-605
- Mascher, F., Zala, M., Linde, C. (2008) Powdery mildew, outline of the new menace on triticale production. In: *Emerging Pathotypes in Cereals*, Piikkiö, Finland, abstract book p13
- McDonald, BA., Linde, C. (2002) The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica*, 124, 165-180

- McDowell, JM., Dangl, JL. (2000) Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Sciences*, 25, 79-82
- Mellersh, DG., Foulds, IV., Higgins, VJ., Heath, MC. (2002) H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions. *Plant Journal*, 29, 257-268
- Mergoum, M., Pfeiffer, WH., Pena, RJ., Ammar, K., Rajaram, S. (2004) Triticale crop improvement: the CIMMYT programme. In: Mergoum, M., Gómez-Macpherson, H. (eds.), *FAO production and protection paper 179: Triticale improvement and production*, 11-26
- Moseman, JG., Scharen, AL., Greeley, LW. (1965) Propagation of *Erysiphe graminis f.sp. tritici* on barley and *Erysiphe graminis f.sp. hordei* on wheat. *Phytopathology*, 55, 92-96
- Mou, Z., Fan, W., Dong, X. (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, 113, 935-944
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt III, B., Dangl, JL. (2003) Recognition and response in the plant immune system. *Annual Review of Genetics*, 37, 579-609
- Niu, JS., He, DX. (2009) Molecular basis of powdery mildew resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *African Journal of Biotechnology*, 8, 4708-4716
- O'Brien, TP., Feder, N., McCully, ME. (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, 59, 368-373
- Oberhaensli, S., Parlange, F., Buchmann, JP., Jenny, FH., Abbott, JC., Burgis, TA., Spanu, PD., Keller, B., Wicker, T. (2011) Comparative sequence analysis of wheat and barley powdery mildew fungi reveals gene colinearity, dates divergence and indicates host-pathogen co-evolution. *Fungal Genetics and Biology*, 48, 327-334
- Olesen, KL., Carver, TLW., Lyngkjaer, MF. (2003) Fungal suppression of resistance against inappropriate *Blumeria graminis* formae speciales in barley, oat and wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62, 37-50
- Peterhänsel, C., Freialdenhoven, A., Kurth, J., Kolsh, R., Schulze-Lefert, P. (1997) Interaction analyses of genes required for resistance responses to powdery mildew in barley reveal distinct pathways leading to leaf cell death. *The Plant Cell*, 9, 1397-1409
- Prats, E., Carver, TLW., Fondevilla, S., Rubiales, D. (2006) Cellular basis of resistance to different formae speciales of *Blumeria graminis* in *Hordeum chilense*, wheat, and tritordeum and agroticum amphiploids. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 28, 577-587
- Pryce-Jones, E., Carver, T., Gurr, SJ. (1999) The roles of cellulase enzymes and mechanical force in host penetration by *Erysiphe graminis f.sp. hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55, 175-182
- Rairdan, GJ., Delaney, TP. (2002) Role of salicylic acid and NIM1/NPR1 in race-specific resistance in *Arabidopsis*. *Genetics*, 161, 803-811
- Salmon, DF., Mergoum, M., Gómez-Macpherson, H. (2004) Triticale production and management. In: Mergoum, M., Gómez-Macpherson, H. (eds.), *FAO production and protection paper 179: Triticale improvement and production*, 27-36

- Schultheiss, H., Dechert, C., Kiraly, L., Fodor, J., Michel, K., Kogel, KH., Huckelhoven, R. (2003) Functional assessment of the pathogenesis-related protein PR-1b in barley. *Plant Science*, 165, 1275-1280
- Shen, QH., Saijo, Y., Mauch, S., Biskup, C., Bieri, S., Keller, B., Seki, H., Ulker, B., Somssich, IE., Schulze-Lefert, P. (2007) Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. *Science*, 315, 1098-1103
- Shetty, NP., Jorgensen, HJL., Jensen, JD., Collinge, DB., Shetty, HS. (2008) Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 121, 267-280
- Skalamera, D., Jibodh, S., Heath, MC. (1997) Callose deposition during the interaction between cowpea (*Vigna unguiculata*) and the monokaryotic stage of the cowpea rust fungus (*Uromyces vignae*). *New Phytologist*, 136, 511-524
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., Métraux, JP. (1997) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 35, 235-270
- Strzembicka, A., Arseniuk, E., Poznan, W. (2006) *Blumeria graminis* sp – an emerging problem of triticale breeding in Poland. In: International Triticale Symposium 2006, Stellenbosch, South Africa, p144
- Svec, M., Miklovicova, M. (1998) Structure of populations of wheat powdery mildew (*Erysiphe graminis* DC f.sp. *tritici* Marchal) in Central Europe in 1993-1996: I. Dynamics of virulence. *European Journal of Plant Pathology*, 104, 537-544
- Tai, YS. (2008) Interactome of signaling networks in wheat: the protein-protein interaction between TaRAR1 and TaSGT1. *Molecular Biology Reports*, 35, 337-343
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., Collinge, DB. (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interactions. *Plant Journal*, 11, 1187-1194
- Tommasini, L., Yahiaoui, N., Srichumpa, P., Keller, B. (2006) Development of functional markers specific for seven *Pm3* resistance alleles and their validation in the bread wheat gene pool. *Theoretical and Applied Genetics*, 114, 165-175
- Torres, MA. (2010) ROS in biotic interactions: A review. *Physiologia Plantarum*, 138, 414-429
- Torres, MA., Jones, JDG., Dangl, JL. (2005) Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*, 37, 1130-1134
- Vanacker, H., Carver, TLW., Foyer, CH. (2000) Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hypersensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiology*, 123, 1289-3000
- Walker, A. S., Bouguennec, A., Confais, G., Leroux, P. (2011) Evidence of host-range expansion from new powdery mildew (*Blumeria graminis*) infections of triticale (x Triticosecale) in France. *Plant Pathology*, 60, 207-220

- Walker, A. S., Bouguennec, A., Masson, E., du Cheyron, P. (2009) Résistance variétale: comment retrouver des triticales résistants à l'oïdium? *Perspectives Agricoles*, 357, 78-84
- Wang, WM., Wen, YQ., Berkey, R., Xiao, SY. (2009) Specific targeting of the Arabidopsis resistance protein RPW8.2 to the interfacial membrane encasing the fungal haustorium renders broad-spectrum resistance to powdery mildew. *The Plant Cell*, 21, 2898-2913
- Wen, YQ., Wang, WM., Feng, JY., Luo, MC., Tsuda, K., Katagiri, F., Bauchan, G., Xiao, SY. (2011) Identification and utilization of a sow thistle powdery mildew as a poorly adapted pathogen to dissect post-invasion non-host resistance mechanisms in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 62, 2117-2129
- Wilson, IW., Schiff, CL., Hughes, DE., Somerville, SC. (2001) Quantitative trait loci analysis of powdery mildew disease resistance in the Arabidopsis thaliana accession Kashmir-1. *Genetics*, 158, 1301-1309
- Wyand, RA. (2001) Molecular evolution of *Blumeria graminis*. PhD Thesis, University of East Anglia, 185p
- Wyand, RA., Brown, JKM. (2003) Genetic and forma specialis diversity in *Blumeria graminis* of cereals and its implications for host-pathogen co-evolution. *Molecular Plant Pathology*, 4, 187-19
- Yahiaoui, N., Srichumpa, P., Dudler, R., Keller, B. (2004) Genome analysis at different ploidy levels allows cloning of the powdery mildew resistance gene *Pm3b* from hexaploid wheat. *Plant Journal*, 37, 528-538
- Yu, DZ., Yang, XJ., Yang, LJ., Jeger, MJ., Brown, JKM. (2001) Assessment of partial resistance to powdery mildew in Chinese wheat varieties. *Plant Breeding*, 120, 279-284
- Yu, L., Niu, JS., Chen, PD., Ma, ZQ., Liu, DJ. (2005) Cloning, physical mapping and expression analysis of a wheat *mlo*-like. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47, 214-222
- Zeyen, RJ., Kruger, WM., Lyngkjaer, MF., Carver, TLW. (2002) Differential effects of D-mannose and 2-deoxym-D-glucose on attempted powdery mildew fungal infection of inappropriate and appropriate Gramineae. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 61, 315-323
- Zhang, C., Czymmek, KJ., Shapiro, AD. (2003) Nitric oxide does not trigger early programmed cell death events but may contribute to cell-to-cell signaling governing progression of the Arabidopsis hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16, 962-972
- Zhang, Z., Henderson, C., Gurr, SJ. (2004) *Blumeria graminis* secretes an extracellular catalase during infection of barley: potential role in suppression of host defence. *Molecular Plant Pathology*, 5, 537-547
- Zhang, Z., Henderson, C., Perfect, E., Carver, TLW., Thomas, BJ., Skamnioti, P., Gurr, SJ. (2005) Of genes and genomes, needles and haystacks: *Blumeria graminis* and functionality. *Molecular Plant Pathology*, 6, 561-575
- Zimmerli, L., Stein, M., Lipka, V., Schulze-Lefert, P., Somerville, S. (2004) Host and non-host pathogens elicit different jasmonate/ethylene responses in Arabidopsis. *Plant Journal*, 40, 633-646