

Zoete immuniteit: effect van exogene fructanen en endogene suikergehalten op de gevoeligheid van appelplanten voor appelschurft (*Venturia inaequalis*)

Sweet immunity: effect of exogenous fructans and endogenous sugar levels on the susceptibility of apple plants to apple scab (*Venturia inaequalis*)

Promotoren:

Prof. Johan Keulemans
Departement Biosystemen
Afdeling Plantenbiotechniek

Prof. Wim Van den Ende
Faculteit Wetenschappen
Afdeling Moleculaire Fysiologie van Planten en Micro-organismen

Masterproef voorgedragen
tot het behalen van het diploma van
Master of science in de bio-ingenieurswetenschappen:
landbouwkunde

Evelien Deleye

juni 2018

"Dit proefschrift is een examendocument dat na de verdediging niet meer werd gecorrigeerd voor eventueel vastgestelde fouten. In publicaties mag naar dit proefwerk verwezen worden mits schriftelijke toelating van de promotor, vermeld op de titelpagina."

Inhoudstafel

Dankwoord	i
Samenvatting	ii
Summary	iii
Afkortingenlijst.....	iv
Tabellenlijst	vii
Figurenlijst.....	vii
Inleiding en problematiek.....	1
Literatuurstudie.....	3
1. Plantenstress.....	3
1.1. Biotische stress	4
2. Appelschurft.....	5
2.1. Symptomen.....	5
2.2. Levenscyclus	7
2.3. Schimmelinfectie	9
3. Verdedigingsmechanismen van de plant tegen biotische stress.....	11
3.1. Geïnduceerde verdediging.....	12
3.1.1. PAMP-getriggerde immuniteit.....	12
3.1.2. Effector-getriggerde gevoeligheid	14
3.1.3. Effector-getriggerde immuniteit	14
3.1.4. Signaaltransductie en transcriptie na herkenning.....	16
3.1.5. Systemisch verworven resistentie	18
3.2. Priming.....	19
3.2.1. Verdedigingsgenen.....	21
3.3. Interactie tussen <i>Venturia inaequalis</i> en appel	24
4. Suikers en zoete immuniteit.....	25
4.1. Suiker signalering	26
4.1.1. Invertasen.....	28
4.2. Suikers als antioxidanten.....	28
4.3. Zoete immuniteit.....	29
4.3.1. Dubbele rol tijdens infectie.....	31
4.3.2. Fructanen als DAMP of MAMP	32

5. Doelstelling	34
Materiaal en methoden	35
1. Biologisch materiaal.....	35
1.1. Appelplanten.....	35
1.2. <i>Venturia inaequalis</i>	37
1.2.1. Preparatie van de sporenoplossing	37
1.2.2. Inoculatie	38
2. Priming componenten	38
2.1. Levanen	39
2.2. Inulinen	39
2.3. Graminanen	39
2.4. Oligogalacturoniden.....	39
2.5. Fosetyl-Aluminium.....	39
3. Experimentele opstelling en staalnames.....	39
3.1. Inoculatie-experiment 1	39
3.2. Inoculatie-experiment 2	40
3.3. Experiment 3: <i>in vitro</i> testen	41
4. Visuele evaluatie appelschurft op bladeren.....	43
5. Kwantificatie groei van <i>V. inaequalis</i> in het blad.....	45
5.1. DNA extractie.....	45
5.2. Kwantitatieve PCR (qPCR).....	45
6. Suikeranalyse via HPAEC-IPAD	46
7. Statistische analyse.....	46
Resultaten en discussie.....	47
1. Inoculatie-experiment 1	47
1.1. Visuele evaluatie.....	47
1.2. Kwantificatie van <i>V. inaequalis</i>	51
1.3. Suikeranalyse.....	52
1.4. Discussie	55
1.4.1. Effect van de priming op de infectie- en sporulatiegraden.....	55
1.4.2. Effect van bladouderdom op de gevoeligheid voor <i>V. inaequalis</i>	58
1.4.3. Effect van primingbehandelingen op suikerconcentraties.....	59
2. Inoculatie-experiment 2	61
2.1. Visuele evaluatie.....	61
2.2. Kwantificatie van <i>V. inaequalis</i>	64

2.3.	Suikeranalyse.....	65
2.4.	Discussie	69
2.4.1.	Effect van de priming op de infectie- en sporulatiegraden.....	69
2.4.2.	Effect van bladouderdom op de gevoeligheid voor <i>V. inaequalis</i>	70
2.4.3.	Effect van primingbehandelingen op suikerconcentraties.....	71
3.	Experiment 3: <i>in vitro</i> testen	72
3.1.	Groei van de schimmelkolonies	72
3.2.	Discussie	74
4.	Algemene Discussie	75
	Conclusies en toekomstperspectieven.....	79
	Referentielijst.....	81
	Vulgariserende samenvatting	97
	Bijlagen	A

Dankwoord

Toen ik na een drukke zomervakantie nog maar juist bekomen was van een prachtig avontuur in Zuid-Afrika startte op 25 september 2017 al een volgend avontuur, namelijk mijn masterthesis. Ik kreeg m'n eigen plantjes in de serre en mocht in de onderzoeklabo's werken, wat voor mij de ideale combinatie was. Ik ben tijdens dit thesisjaar altijd graag bezig geweest met mijn experimenten, vooral omdat ik veel bijleerde en me zo een echte wetenschapster voelde. Dit project kon ik natuurlijk niet tot een goed einde brengen zonder de hulp van vele mensen. Als eerste zou ik graag professor van den Ende en professor Keulemans willen bedanken voor het vrijgeven van dit interessante onderwerp en de ervaring die ik opgedaan heb. Ik heb, eerlijk gezegd, nooit spijt gehad van mijn keuze voor dit onderwerp. Dit kwam vooral door de grote variatie binnen dit onderzoeksdomein, maar ook door het team waar ik mee mocht samenwerken. Daarnaast dank voor jullie input bij het verbeteren van mijn thesis.

Vervolgens wil ik Anze bedanken. Jij bent de persoon waar ik het meeste van mijn tijd heb mee doorgebracht het afgelopen jaar, wat ik eigenlijk niet erg vond, aangezien jouw enthousiasme en gedrevenheid aanstekelijk werkten. Verder zorgde je ook voor de nodige humor, waardoor ik altijd met een glimlach kwam werken. Bedankt voor je bezorgdheid en al jouw inzet, ik ben blij dat jij mijn begeleider was !

Daarnaast wil ik Lukasz bedanken. Jij was mijn tweede begeleider en stond ook altijd voor mij klaar als ik vragen had. Verder zou ik graag Johan Verheyen, Tine Verhoeven en Poi Verwilt willen bedanken voor jullie hulp in de serre en Maxime Versluys, Tom Struyf, Rudy Vergauwen en Amélie Grammen voor jullie uitleg in het labo.

Uiteraard kunnen mijn twee Die Hard THUIS-fanaten niet ontbreken in mijn dankwoord. Niels, een grote dankuwel voor je hulp als staalnemer, maar vooral voor je PC-Dokter skills die mijn problemen steeds wisten op te lossen. Benedikt, maar toch zeg ik liever Benie, heel erg bedankt voor het uitwisselen van leerrijke dia's, je hulp op de trein en voor het nalezen van mijn thesis, want wie kan dit beter dan jij.

Martijn, ik wil jou enorm bedanken voor al je hulp aan mijn thesis, maar vooral voor je onvoorwaardelijke steun, vertrouwen en behulpzaamheid bij mij thuis. Je geduld werd serieus op de proef gesteld deze periode, maar beterschap is in zicht. Bedankt schatje ! Tot slot wil ik mijn broer, vrienden, ouders en familie bedanken voor de steun en luisterende oren. Zo, na 2 jaar KULAK en 4 jaar KU Leuven is het kroonstuk op mijn bio-ingenieursstudie af !

Samenvatting

Wereldwijd is appel (*Malus x domestica*) een belangrijk economisch gewas met vorig jaar een productie van 233 716 ton. Echter leiden verschillende ziekten en plagen tot grote productieverliezen en hoge kosten voor de sector door hun chemische bestrijding. De meest destructieve ziekte in de commerciële appelteelt is appelschurft, een schimmelziekte veroorzaakt door de hemibiotroof *Venturia inaequalis*. Toepassingen met fungiciden verzekeren bescherming tegen appelschurft en een stabiele appelproductie. Daarentegen leidt een veelzijdig gebruik van fungiciden tot het ontstaan van fungicide-resistente schurftstammen. Een meer duurzaam en ecologisch verantwoord alternatief is daarom dringend nodig waarmee onder andere appelschurft kan bestreden worden. In deze context hebben suikers recent belangstelling gekregen omwille van hun potentieel primende werking op het immuunsysteem van de plant, dat hierdoor sneller en sterker kan reageren op een toekomstige pathogeenaanval. In twee inoculatie-experimenten werden de drie jongste en meest schurftgevoelige appelbladeren geprimed door ze te vernevelen met drie verschillende fructanen: graminanen, inulinen en levanen. Bovendien werd ook de potentiële primende werking van oligogalacturoniden getest. Priming met fosetyl-aluminium en water werd respectievelijk als positieve en negatieve controle ingezet. Drie dagen later werden de geprimede bladeren geïnoculeerd met conidiosporen van *V. inaequalis* en werden de macroscopische sporulatiesymptomen opgevolgd. Daarnaast werden ook bladstalen genomen om het *V. inaequalis* DNA en suikerconcentraties (glucose, fructose en sucrose) te bepalen, om zo mogelijke effecten van een verbeterde verdediging van de bladeren te kunnen linken aan het suikermetabolisme. Tot slot werd ook het direct effect van de geteste primingcomponenten onderzocht op de *in vitro* groei van *V. inaequalis*. Door een hoge gevoeligheid voor *V. inaequalis* van de appelbladeren na priming met graminanen en oligogalacturoniden, blijken deze componenten zwakke *sweet immunity* primers te zijn. Daarentegen lijken inulinen de schimmelgroei significant te stimuleren op de appelbladeren alsook *in vitro*. Levanen lijken wel potentiële primers van de plantverdediging te zijn door een vermindering van sporulatiesymptomen en *V. inaequalis* DNA. Levanen kunnen zich gedragen als een PAMP molecule en hierdoor een sterke daling van het totaal suikergehalte, en meer specifiek van het glucosegehalte, in de bladeren na priming veroorzaken. Dit doet ons geloven dat *V. inaequalis* een bepaalde hoeveelheid endogene suikers nodig heeft voor een succesvolle sporulatie en ontwikkeling, en bijgevolg geclassificeerd kan worden als een *high sugar disease*.

Summary

Globally, apple production has an economic importance, with yearly production of 233 716 metric tons. However, numerous diseases and pests cause big losses and high costs for their chemical management. The most devastating disease in the commercial apple cultivation is apple scab, a fungal disease caused by the hemibiotrophic *Venturia inaequalis*. High majority of fungicide applications are used to assure protection against apple scab and stable fruit production. High number of fungicide applications has been associated with the appearance of fungicide-resistant races of *V. inaequalis*. A more sustainable and ecologically friendlier strategy to manage apple scab, and other diseases and pests, therefore needed. Defense priming of the plant's immune system with sugars can stimulate the plant to counter future pathogenic attacks faster and stronger than an unprimed defense system.

The 'sweet immunity' concept was examined on the *V. inaequalis* – *Malus x domestica* pathosystem in this thesis. In our two inoculation-experiments the three youngest and most susceptible apple leaves were primed by spray-applications of three fructans: graminans, inulines and levans. Additionally, the potential priming action of oligogalacturonides was tested. Priming with fosetyl-aluminium and water were used as positive and negative control. Three days later primed leaves were inoculated with the conidiospores of *V. inaequalis* and the development of macroscopic sporulation symptoms was followed up. The leaves were sampled for quantification of *V. inaequalis* DNA and of sugar concentrations (glucose, fructose and sucrose), in order to link potential effects of enhanced defence and sugar metabolism. Finally, the direct effect of the used priming compounds on *in vitro* growth of *V. inaequalis* was investigated.

Due to a high susceptibility of apple leaves to *V. inaequalis* after priming with graminans and oligogalacturonides, these compounds seem to be very weak sweet immunity primers. Inulines significantly stimulated growth of *V. inaequalis* on the apple leaves and *in vitro*, on the other hand levans seem to be potential defense primers. Their priming effect is reduction of sporulation symptoms and *V. inaequalis* DNA. Levans can act as a PAMP molecule causing a big decrease in total sugar content, especially a decrease in glucose, in the apple leaves after priming. Thus, *V. inaequalis* likely needs a certain amount of endogenous sugars for a successful sporulation and development and as a matter of fact it can be classified as a high sugar disease, being more virulent on high sugar containing tissue.

Afkortingenlijst

ABA	Abscine zuur
ABA-GE	Abscine zuur-glucose ester
ADP	Adenosine difosfaat
Al	Aluminium
ALD1	<i>ADP ribolysation factor GTPase-activating protein-like defense protein 1</i>
ATP	Adenosine trifosfaat
Avr	Avirulentie
BABA	<i>β-aminobutyric acid</i>
BFO	Burdock fructooligosacharide
C	Koolstof
CaM	Calmoduline
CaMTA3	Calmoduline binding transcriptie activator 3
CAT	Catalase
CBP60	<i>Calmodulin binding protein 60</i>
CC	<i>Coiled-Coil</i>
CDPK	Calciumafhankelijke proteïne kinase
CERK1	Chitine elicitor receptor kinase1
CWDE	<i>Cell wall degrading enzyme</i>
CWI	Celwand invertase
DAMP	<i>Damage-Associated molecular pattern</i>
DIR1	<i>Defective in Induced Resistance protein 1</i>
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
dpi	<i>Days post infection</i>
DSP	<i>Dual specificity phosphatase</i>
EIN3	<i>Ethylene insensitive 3</i>
ERF1/6	Ethyleen respons factor 1/6
ET	Ethyleen
ETI	<i>Effector-triggered immunity</i>
ETS	<i>Effector-triggered susceptibility</i>
FEH	Fructan exohydrolase
FMO1	Flavine mono-oxygenase 1
FOS	Fructo-oligosacharide
Fru	Fructose
GFS	Glucose, fructose en sucrose
G3P	Glucose-3-fosfaat
Glc	Glucose
GSH	Glutaminylcysteïnylglyceïne
H	Waterstof
HPAEC-IPAD	<i>High performance anion exchange chromatography-Integrated pulsed amperometric detection</i>
H ₂ O ₂	Waterstofperoxide
HcrVf2	Homoloog tot <i>C. fulvus</i> R genen van de <i>Vf</i> regio; syn. <i>Vfa2</i>
HR	Hypersensitieve reactie
HXK	Hexokinase
ICS	Isochorismaat synthase

INV	Invertase
ISR	<i>Induced Systemic Resistance</i>
JA	Jasmonaat
LG	<i>Linkage group</i>
LRPKm1	<i>Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase</i>
LRR	<i>Leucine-rich repeat</i>
LysM	Lysine motief
MAMP	<i>Microbe-associated molecular pattern</i>
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
MAPK/MPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAT	<i>Mating type</i>
MeSA	Methyl salicylaat
mFOS	Microbiële fructooligosaccharide
MPKK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MPKKK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i>
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide fosfaat
NB	Nucleotide binding
NB-LRR	<i>Nucleotide binding-leucine-rich repeat</i>
NO	Stikstofmonoxide
NPR	<i>Non-expressor of pathogenesis-related protein</i>
O	Zuurstof
O ₂ •	Superoxide radicaal
OG	Oligogalacturonide
OH•	Hydroxyradicaal
OPP	<i>Oxidative pentose phosphate</i>
PAL1	<i>Phenylalanine ammonia-lyase 1</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PCD	Geprogrammeerde celdood
PDF	Plant defensine
pFOS	Plant fructooligosaccharide
PinB	Puroindoline B
Pip	<i>Pipecolic acid</i>
PM	Plasmamembraan
PR	<i>Pathogenesis related</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i>
PTP	Tyrosine fosfatase
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
R	Resistentie
RFO	<i>Raffinose-family oligosaccharide</i>
RH	<i>Relative humidity</i>
RIN4	<i>Resistance to Pseudomonas Syringae pv. Maculicola 1 interacting protein 4</i>
RLK	<i>Receptor-like kinase</i>
RLP	<i>Receptor-like protein</i>
RNA	Ribonucleïnezuur
RNI	Reactief stikstof intermediair
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	Ronden per minuut
RPM1	<i>Resistance to Pseudomonas Syringae pv. Maculicola 1</i>

RPS2	<i>Resistance to Pseudomonas Syringae 2</i>
SA	Salicylic zuur
SAR	<i>Systemic acquired resistance</i>
Ser	Serine
SnRK1	<i>Sucrose non-fermenting-1-related kinase</i>
SOD	Superoxide dismutase
Suc	Sucrose
SWEET	<i>Sugars will be eventually effluxed transporter</i>
TF	Transcriptiefactor
T6P	Trehalose-6-fosfaat
Thr	Threonine
TIR	Toll-Interleukine-1 Receptor
Tyr	Tyrosine
VIF	Variantie inflatie factor
WAK	<i>Cell wall-associated kinase</i>

Tabellenlijst

- Tabel 1:** De vergelijking van de relatieve glucose, fructose en sucrose-inhouden voor alle behandelingen tussen vóór de priming, vóór de inoculatie (0 dpi) en 14 dagen na de inoculatie (14 dpi) met *V. inaequalis* van het eerste experiment..... 55
- Tabel 2:** De vergelijking van de relatieve glucose, fructose en sucrose-inhouden voor alle behandelingen tussen vóór de priming, vóór de inoculatie (0 dpi), 4 en 14 dagen na de inoculatie (4 en 14 dpi) met *V. inaequalis* van het tweede experiment..... 68

Figurenlijst

- Figuur 1:** Infectiecurven van Mills 5
- Figuur 2:** Schurftlesies bij geïnfecteerde vruchten door *V. inaequalis*..... 6
- Figuur 3:** Schurftlesies bij een geïnfecteerd blad door *V. inaequalis* 6
- Figuur 4:** Schematische voorstelling van de ziektecyclus van *V. inaequalis* 8
- Figuur 5:** Schematische voorstelling van de verschillende genetische verdedigingsmechanismen van de plant als reactie op een pathogeeninfectie door middel van het zigzagmodel 15
- Figuur 6:** Priming door Conrath (2011) in planten 20
- Figuur 7:** Schematische voorstelling van inuline, levaan en graminaan..... 27
- Figuur 8:** Het model van Versluys *et al.* (2017) waarin fructanen via hun rol als DAMP's of MAMP's plant immuniteitsreacties kunnen induceren 33
- Figuur 9:** Voorstelling van de appelbladeren per positie.. 36

Figuur 10: Structuur van Neubauer telplaat.	37
Figuur 11: Constructie van de inoculatie tent die gebruikt werd voor de infectie van appelzaailingen met <i>V. inaequalis</i> sporen.	38
Figuur 12: Transfer van cirkel uit <i>V. inaequalis</i> kolonie naar een malt medium met een toegevoegd getest priming component.....	42
Figuur 13: Voorstelling van de 5 verschillende klassen volgens Chevalier <i>et al.</i> (1991).....	44
Figuur 14: Formule van Townsend en Heuberger (1943).....	44
Figuur 15: De visuele evaluaties van het eerste experiment gebaseerd op blad 1, 2 en 3 voor alle behandelingen.....	48
Figuur 16: De visuele evaluaties van het eerste experiment voor alle behandelingen.	51
Figuur 17: De kwantificatie-analyse van het eerste experiment.....	52
Figuur 18: Totaal suikergehalte, glucose, fructose en sucrose, bij bladstalen gebaseerd op blad 1, 2 en 3 vóór de priming, net vóór de inoculatie (0 dpi) en 14 dagen na inoculatie (14 dpi) met conidiosporen van <i>V. inaequalis</i> van het eerste experiment.....	54
Figuur 19: De visuele evaluaties van het tweede experiment voor alle behandelingen.	62
Figuur 20: De visuele evaluaties van het tweede experiment voor alle behandelingen..	64
Figuur 21: De kwantificatie-analyse van het tweede experiment.....	65
Figuur 22: Totaal suikergehalte, glucose, fructose en sucrose, bij bladstalen gebaseerd op blad 3 vóór de priming, net vóór de inoculatie (0 dpi), 4 en 14 dagen na inoculatie (4 en 14 dpi) met conidiosporen van <i>V. inaequalis</i> voor alle behandelingen van het eerste experiment.....	68
Figuur 23: <i>In vitro</i> testen voor alle behandelingen met specifieke concentratie.....	74

Inleiding en problematiek

Op een gemiddelde dag eten 64 % van de Belgen een stuk fruit met daarbij appel als koploper (VLAM, 2014). De cultuurappel (*Malus x domestica*) is een complexe hybride soort ontstaan uit kruisingen tussen *Malus sylvestris* en enkele Aziatische appelsoorten. Met een geschatte wereldproductie van 76.2 miljoen ton verse appels in 2017-2018 behoren appels tot de belangrijkste fruitsoort in de wereld (USDA, 2017). China en de Verenigde Staten zijn de twee grootste producenten. In 2016-2017 nam de appelteelt in België een oppervlakte in van 6 491 ha met een productie van 233 716 ton (VLAM Marketingdienst, 2017). De pitfruitteelt in Vlaanderen omvat met ongeveer 14 300 hectare, net geen 3 % van het Vlaamse landbouwareaal.

Veel gewassen die vandaag de dag geteeld worden, bereiken hun maximaal potentiële opbrengst niet. De invloed van abiotische variatie zoals droogte, ziekte of hagel en biotische factoren (micro-organismen, insecten) brengen de plant in een toestand van stress. Stress wordt onderverdeeld in twee soorten, namelijk biotische en abiotische stress. De meest destructieve ziekte in de appelteelt is appelschurft en wordt veroorzaakt door de schimmel *Venturia inaequalis* (Cooke Wint). Deze biotische stress zal de groei van de plant onderdrukken, waardoor opbrengstverliezen zullen ontstaan. Daarnaast zijn er ook directe verliezen omwille van schurftsymptomen op de appelvruchten. Deze economische verliezen kunnen oplopen tot ongeveer 80 % van de initiële productiewaarde indien er niet wordt ingegrepen (Zucoloto *et al.*, 2017). Telers combineren preventieve en curatieve fungicidenbehandelingen om de fungusontwikkeling op een zo efficiënt mogelijke manier te onderdrukken (Belete & Boyraz, 2017). Door deze chemische controle kan een hogere opbrengst van het gewas bekomen worden en kan de voedselproductie op peil gehouden worden. Hierbij kan het software programma RIMpro gebruikt worden als hulpmiddel om het risico op appelschurft te voorspellen. Daardoor kan ook het aantal fungicidenbehandelingen verminderen, aangezien deze uitzonderlijk kunnen oplopen tot 29 in één enkel groeiseizoen (Van Melckebeke, 1990; Way *et al.*, 1991; Rosenberger, 2016). De intense chemische bestrijding heeft niet alleen een duur prijskaartje voor de teler, maar is ook schadelijk voor zowel de menselijke gezondheid als voor het ecosysteem en de omgeving. De wetgeving limiteert dan ook sterk het gebruik van pesticiden. Om maximale residuen in het voedsel niet te overschrijden, werd voor elk pesticide een veiligheidstermijn ingevoerd. Dit betekent dat er een minimale tijd moet zijn tussen de behandeling met het pesticide en de oogst van het gewas, waarna de overblijvende (lage) residuen op het gewas niet meer als toxisch voor de mens kunnen aangezien worden. Bovendien

ontbreekt een correct pesticidemanagement in vele ontwikkelingslanden en ook in ontwikkelde landen wordt niet altijd correct omgesprongen met pesticide-adviezen. Het veelvuldig gebruik van pesticiden gaat ook gepaard met het ontstaan van fungicide-resistente schurftstammen. Vanuit het oogpunt van een meer duurzame en ecologisch verantwoorde landbouw wordt daarom wereldwijd dringend gezocht naar alternatieven waarmee appelschurft, en andere ziekten en plagen, kunnen bestreden worden.

Resistentie tegen fungiciden (Carrisse & Jobin, 2006) en het doorbreken van resistentie bij resistente cultivars (Parisi & Lespinasse, 1996) komen vandaag de dag meer en meer voor bij appel. Daarnaast neemt ook de virulentie van appelschurft toe op bepaalde appelcultivars. Selectie voor zogenaamde *soft growth* karakteristieken verbeterde eigenschappen zoals smaak, textuur en nutritionele waarde, maar ging ten koste van fysische en biochemische verdedigingsmechanismen tegen biotische stressoren (Versluys *et al.*, 2016). Hoewel genetisch gemodificeerde gewassen hier een oplossing kunnen bieden, ligt dit onderwerp nog steeds zeer gevoelig en maakt het deel uit van een moeilijk maatschappelijk debat. Daarnaast vormt het ‘primen’ van het immuunsysteem van de plant door toediening van natuurlijk beschikbare stoffen zoals fructanen een recenter alternatief. Sommige suikers kunnen fungeren als primers om verdedigingsmechanismen te triggeren die de plant kunnen beschermen tegen zowel biotische als abiotische stress (Bolouri-Moghaddam & Van den Ende, 2012; Morkunas & Ratajczak, 2014; Trouvelot *et al.*, 2014). In deze thesis willen we daarom onderzoeken of een exogene fructaantodiening een duidelijke verdedigingsrespons ten opzichte van appelschurft kan induceren en wat hiervan het effect is op de endogene suikergehalten. Er wordt getracht via deze ‘zoete priming’ een betere ziekteresistentie of -tolerantie tegen appelschurft te bekomen.

Literatuurstudie

1. Plantenstress

Planten zijn sessiele organismen en kunnen in tegenstelling tot dieren niet ontsnappen aan hun continu veranderende omgeving. Door deze suboptimale situatie worden planten zowel in de landbouw als in de natuur vaak blootgesteld aan één of meerdere stressfactoren. Hierdoor kunnen planten hun volledig genetische potentieel niet inzetten op ontwikkeling en reproductie (Caverzan *et al.*, 2016). Deze omgevingsstress kan veroorzaakt worden door abiotische en/of biotische stressfactoren. De meest voorkomende abiotische stresscondities worden veroorzaakt door droogte, een hoog zoutgehalte, hoge of lage temperaturen, overstroming, alsook ionische-, voeding- of zware metalen stress en door mechanische stress teweeggebracht door wind, licht of straling (Eyidogan *et al.* 2012). Volgens Farooq *et al.* (2012) is droogte echter wereldwijd de meest vernietigende abiotische factor. Daarnaast omvat biotische stress schade en opbrengstverliezen te wijten aan onkruiden, pathogenen (virussen, bacteriën en schimmels), nematoden, insecten, knaagdieren en herbivoren. Belangrijk is op te merken dat deze stressoren niet altijd schade aanrichten. Enkel indien de respons van de plant op een stressfactor onvoldoende is voor een geslaagde adaptatie of acclimatisatie, zal de plant significante schade oplopen. Bovendien verschilt het gecombineerd effect van meerdere stress inducerende invloeden van het additief effect van elke invloed van de stressfactor afzonderlijk (Suzuki *et al.*, 2014).

Daarnaast brengt de klimaatopwarming, globaal gezien, zowel abiotische als biotische stress met zich mee. Klimaatmodellen voorspellen meer warme dagen, hittegolven, droogtes, hevige regenvallen en overstromingen (Agarwal, 2007). Temperatuurstijgingen en fluctuaties in neerslag zullen in de toekomst niet alleen de waterbeschikbaarheid, maar ook de gewasopbrengsten negatief beïnvloeden (Kang *et al.*, 2009). Zo zou een bijkomende temperatuurstijging van 2°C de rijstopbrengst met 0.75 ton/ha doen dalen in hoge opbrengstgebieden (Sinha & Swaminathan, 1991). Volgens IPCC (2014) komt dit neer op een wereldwijd economisch verlies van 0.2 tot 2.0 % van het inkomen. In dit warmere klimaat zouden ziekten en plagen ook actiever worden en hun geografisch gebied uitbreiden (migratie). Deze voorspelling gecombineerd met de intensiteit en duur van regenvallen zal het pesticidengebruik drastisch doen stijgen, wat zal leiden tot hogere kosten op zowel economisch als ecologisch vlak (Rosenzweig *et al.*, 2001). De impact van de klimaatopwarming op de

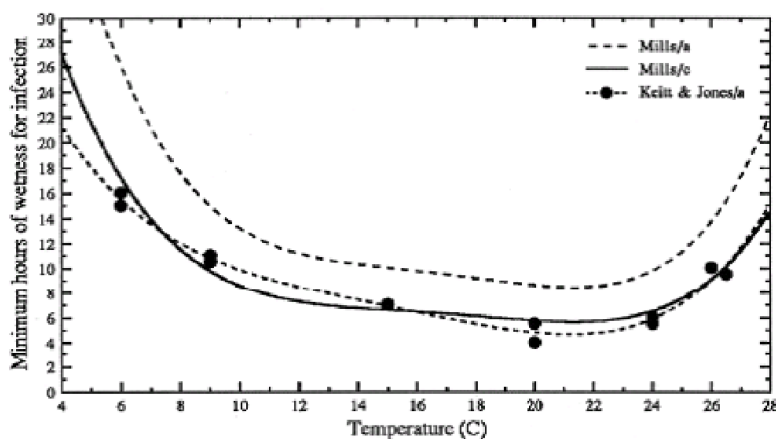
gewasproductie is de laatste decennia dan ook een prioriteit geworden in het onderzoek (Shanker & Shanker, 2016). Door de eeuwen heen hebben planten morfologische (bv. dikkere cuticula) en fysiologische (bv. dormantie) adaptatiemechanismen ontwikkelt om te kunnen omgaan met niet optimale condities (Cánovas *et al.*, 2017). Daarnaast beschikt de plant over verdedigingsmechanismen om stress te overwinnen (Kempel *et al.*, 2011). Dit wordt uitgebreid besproken in paragraaf 3: Verdedigingsmechanismen van de plant tegen biotische stress.

1.1. Biotische stress

Biotische stress is een toestand die verhindert dat de plant zijn normale functies kan uitoefenen door levende organismen (Mahajan & Tuteja, 2005). Bij de meeste gewassen veroorzaakt biotische stress gemiddeld 25 % productieverliezen wereldwijd (Savary *et al.*, 2012). De belangrijkste plantpathogenen omvatten de schimmels, bacteriën, nematoden en virussen (Gimenez *et al.*, 2018). Alle gekende plantenziekten worden in 70 % van de gevallen veroorzaakt door schimmels (Shi *et al.*, 2016). Plantenziekten kunnen ingedeeld worden volgens meerdere classificatiemethoden. Volgens een eerste methode kunnen pathogenen ingedeeld worden in boven- of ondergrondse ziekteverwekkers afhankelijk van het weefsel dat ze infecteren (Berger *et al.*, 2007). Een tweede en meer belangrijkere classificatie deelt pathogenen op in necrotrofen, biotrofen of hemibiotrofen. Necrotrofen verkrijgen hun nutriënten uit (afge)dood organisch materiaal door productie van toxines of enzymen zoals polygalacturonidase, terwijl biotrofen een relatie aangaan met de plant om zo hun nutriënten uit levend plantenweefsel te halen. *Puccinia graminis* en *Blumeria graminis* behoren tot de biotrofen, terwijl *Botrytis cinerea* en *Pythium ultimum* voorbeelden zijn van necrotrofen. Aangezien necrotrofen plantenweefsel snel afdoden, zijn ze schadelijker dan biotrofen. Hemibiotrofen zoals *V. inaequalis* hebben zowel een biotrofe als een necrotrofe fase waarbij de pathogeen de plant in eerste instantie laat leven om vervolgens over te gaan naar een necrotrofe fase (Cammue, 2016). In kader van deze thesis is het niet onbelangrijk om een derde classificatiemethode, geïntroduceerd door Horsfall en Dimond (1957), te vermelden die plantpathogenen en bijbehorende ziektes onderverdelen in *high* en *low sugar diseases*. Zij stellen dat pathogenen onderverdeeld kunnen worden afhankelijk van de suikerconcentraties in de geïnfecteerde weefsels. Plantpathogenen die geclassificeerd worden onder *high sugar diseases* zijn het meest virulent in weefsels met een hoge suikerconcentratie. Naarmate de suikerconcentratie daalt in deze weefsels, neemt hun virulentie of graad van pathogeniciteit af. Het omgekeerde geldt voor *low sugar diseases*. Echte meeldauw is een voorbeeld van een *high sugar disease*, terwijl *Alternaria solani* een *low sugar disease* is (Horsfall & Dimond, 1957).

2. Appelschurft

Appelschurft is wereldwijd de meest vernietigende ziekte van de gecultiveerde appel. Schade komt vooral voor bij jonge, groeiende vruchten en bladeren, waardoor zowel de vruchtkwaliteit, opbrengst als opslagtijd daalt. Een daling van de vruchtkwaliteit wordt veroorzaakt door esthetische schade zoals schuiftvlekken, scheuren en vervormingen van de appels. Appelschurft wordt veroorzaakt door een infectie van de ascomycete *V. inaequalis* (Cooke Wint). Ze infecteert planten van de subfamilie *Maloideae* en het geslacht *Malus* waartoe alle appelcultivars behoren. De schimmel komt voor in een breed geografisch gebied en wordt teruggevonden in bijna alle gebieden waar appels commercieel geteeld worden. Mills en LaPlante hebben in 1954 voor het eerst grafieken opgesteld die het combinatie-effect van temperatuur en bladnatperiode op de schimmelgroei weergeeft voor een succesvolle infectie (Fig. 1). Uit deze infectiecurven werd afgeleid dat de ziektedruk het zwaarst is in gebieden met een gematigd klimaat en koude maar vochtige lentes zoals in België (MacHardy, 1996). Daarnaast liggen deze grafieken ook aan de basis van de ontwikkeling van een waarschuwingsprogramma zoals RIMpro (Trapman & Polfliet, 1997), waardoor efficiëntere fungicide toepassingen mogelijk werden tegen appelschurft.



Figuur 1: Infectiecurven van Mills. Deze curven tonen aan hoeveel uren een nat bladoppervlak nodig is in functie van de temperatuur om een schurftinfectie door ascosporen te krijgen onder veldcondities (Mills/a), in een gecontroleerde omgeving (Keitt & Jones/a) en om een infectie door conidia te krijgen onder veldcondities (Mills/c; MacHardy, 1996).

2.1. Symptomen

Appelschurft tast de bovengrondse delen van de plant aan. De infectie symptomen zijn waarneembaar op verschillende plantendelen zoals kroonbladeren, kelkbladeren, knopschubben en jonge scheuten, maar voornamelijk op bladeren en vruchten van appelbomen (MacHardy, 1996; Turecheck, 2004). De jongste vruchten en bladeren vormen belangrijke

toegangspoorten voor de schimmel *V. inaequalis* en zijn hierdoor het meest gevoelig voor appelschurft. Vruchten kunnen over de hele oppervlakte schurftlesies hebben, maar meestal zijn ze gefocust rond de calyx. De lesies worden groter, kurkachtig en necrotisch, waardoor de vrucht op die plaats niet meer kan uitzetten en er scheuren ontstaan die opnieuw kansen bieden aan secundaire pathogenen (Fig. 2; Turechek, 2004; Jha *et al.*, 2009). De schurftlesies hebben een bruine tot zwarte kleur. Verder kunnen vruchten een abnormale groei ontwikkelen of van de boom afvallen. Ook tijdens de opslagperiode kunnen vruchten nog schurftsymptomen vertonen (Carisse & Jobin, 2006).



Figuur 2: Schurftlesies bij geïnfecteerde vruchten door *V. inaequalis* (Barron, 2013).

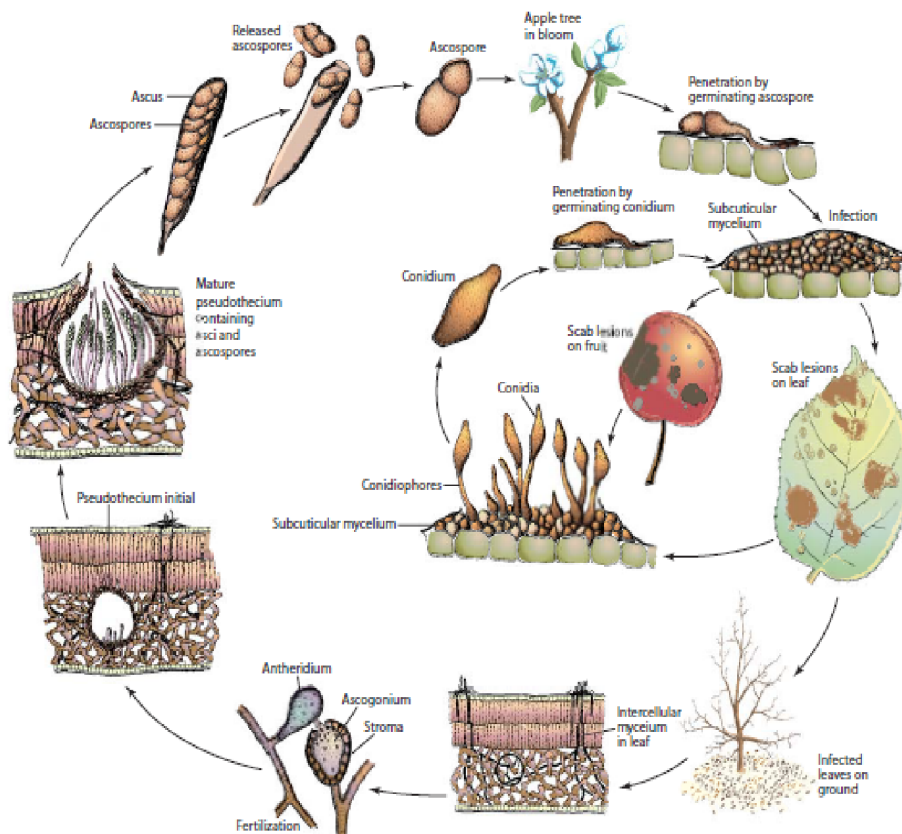


Figuur 3: Schurftlesies bij een geïnfecteerd blad door *V. inaequalis*.

Daarnaast brengt appelschurft lesies op de bladeren met zich mee. In het begin zijn deze klein, bleek en onregelmatig van vorm. Naarmate de schurftlesies ouder worden, krijgen ze een circulaire vorm en olijfgachtige kleur. Daarna worden de lesies bruinzwart (Fig. 3), verdrogen en vervormen de bladeren en vallen uiteindelijk af. Appelschurft zal de boom niet doden, maar kan bladval induceren. Dit zal de appelboom verzwakken door een verminderde aanvoer van fotosynthese producten, waardoor zijn overleving tijdens de wintercondities negatief beïnvloed wordt. Verder zorgt deze bladval ook voor verminderde bloemknopvorming en dus een lagere opbrengst aan appels in het daaropvolgende seizoen. Aderhold stelde in 1900 vast dat jonge bladeren gemakkelijker geïnfecteerd worden dan oudere bladeren waarmee het begrip ‘ontogene resistentie’ geboren werd, wat een horizontale resistentie is. Bovendien vond Schwabe (1979) een negatieve correlatie tussen het aantal lesies en de leeftijd van het blad. Desalniettemin kunnen oudere bladeren later in het seizoen ook hun resistentie verliezen (MacHardy, 1996).

2.2. Levenscyclus

Venturia inaequalis is een hemiobiotrofe schimmel aangezien deze in zowel levende als dode bladeren kan groeien in één levenscyclus. De één jaar durende levenscyclus van *V. inaequalis* kan opgesplitst worden in twee delen, namelijk één generatieve of seksuele fase en één of meerdere vegetatieve of aseksuele fasen. Het seksueel stadium komt vooral voor tijdens de winter, maar kan reeds starten in de herfst na bladval. Tijdens deze periode komen de geïnfecteerde bladeren op de grond terecht. De schimmel penetreert diep in het bladweefsel en leeft maximum vier weken op saprofytische wijze. Daarna schakelt de schimmel over van een vegetatieve naar een reproductieve fase. Hierbij ontwikkelt de schimmel vruchtlichamen of pseudothecia die de schimmel beschermen tegen de winter. Aangezien *V. inaequalis* tot de anisogame schimmels behoort, zijn de geslachtsorganen gedifferentieerd in mannelijke antheridia en vrouwelijke ascogonia. *V. inaequalis* is ook heterothallisch, wat betekent dat beide geslachtskernen van een verschillend paringstype moeten zijn om een succesvolle versmelting te bekomen. Dit paringstype wordt bepaald door een complexe interactie van genproducten die gecodeerd worden door allelen gelegen op het *mating type* (MAT) locus (Gisi *et al.*, 2002; Billiard *et al.*, 2011). Na versmelting of plasmogamie van de mannelijke en vrouwelijke gametangia met behulp van een trichogyne ontstaan er ascosporen in de asci binnenin het pseudothecium tijdens de lente (zie Fig. 4). Elke asci bevat acht ascosporen. Dit zijn de seksuele sporen die bij gunstige omstandigheden zoals dauw of regen uit de asci worden gekatapulteerd en verder verspreid worden via regendruppels en wind (tot 200 m; Turechek, 2004). Deze ascosporen hebben een celwand aan de binnen- en buitenkant. De celwand aan de buitenkant is dun en breekbaar, terwijl deze aan de binnenkant dik en elastisch is om zo de sporen te kunnen beschermen tegen de winter. Tijdens regenachtige perioden wordt een dunne waterfilm rond de pseudothecia gevormd, omdat de asci water absorberen en op die manier dus uitzetten. Door de opgebouwde druk breekt eerst de buitencelwand van de asci waarop de binnencelwand volgt. Hierdoor worden de ascosporen uitgestoten om de vegetatieve levenscyclus van de schimmel te starten (Rossi *et al.*, 2001).



Figuur 4: Schematische voorstelling van de ziektecyclus van *V. inaequalis* (Belete & boyraz, 2017).

Vervolgens zullen de ascosporen op een jong en gevoelig blad terechtkomen en indien de weercondities gunstig zijn volgens de weercurven van Mills en LaPlante, zullen deze sporen kiemen en verder mycelium aanmaken. Het infectieproces wordt uitgebreid besproken in de volgende paragraaf. Het mycelium bestaat uit ascogene hyfen en vormt bruine lesies. Deze lesies bestaan uit proteïnen en koolhydraten die opgebouwd zijn uit β -galactose en N-acetylglucosaminylnyl residuen. Deze periode van primaire infectie die ascosporen produceert, duurt gewoonlijk zes tot acht weken en start vanaf het groene knop stadium en eindigt twee weken na vruchtzetting. Later krijgen de lesies van de primaire infectie een fluweelachtig uitzicht, wat wijst op matuur mycelium. Sommige hyfen uit het mycelium gaan zich aan hun top verder ontwikkelen tot sporendragers of conidioforen waarin zich conidiën of conidiosporen vormen (Jha *et al.*, 2009). Het mycelium van *V. inaequalis* is tijdens deze biotrofe fase gelimiteerd tussen de cuticula en de epidermis van de buitenste celwand (Struck, 2006). De conidioforen breken doorheen de cuticula, waardoor deze beschadigd wordt en waarna ze macroscopisch waarneembaar zijn als typische schurftvlekken of lesies (zie Fig. 2). Ze verschijnen negen tot dertig dagen na de initiële infectie. Elke lesie bevat duizenden conidiosporen. Deze asexuele sporen worden ook via wind en regen verder verspreid, maar

minder ver (<100 m) dan de ascosporen (Turecheck, 2004). Indien deze sporen op natte bladeren of vruchten landen, zullen nieuwe lesions/hyfes ontstaan die op hun beurt de cuticula zullen binnendringen en nieuwe conidiosporen zullen produceren. Deze tweede infectie periode op bladeren en vruchten kan gedurende de hele zomer aangehouden worden, zolang de weercondities het toelaten. Als de voorwaarden van Mills voor de sporenproductie voldaan zijn en er jonge bladeren/vruchten aanwezig zijn, kunnen in één groeiseizoen meerdere vegetatieve cyclussen plaatsvinden.

2.3. Schimmelinfectie

Het succesvol koloniseren van een plant door de schimmel, het onttrekken van nutriënten aan de plant en tot slot de reproductie hangen hoofdzakelijk af van een efficiënt infectiemechanisme (Struck, 2006). Infectiemechanismen zijn zeer variabel tussen verschillende plant pathogene schimmels. Het infectieproces zelf kan opgedeeld worden in drie verschillende morfologische fasen: (1) adhesie, (2) sporenkieming en (3) vorming van infectiestructuren zoals een appressorium (drukorgaan) en een penetratiehyfe (Struck, 2006). Schimmelsporen moeten zich eerst vasthechten aan het bladweefsel zodat ze niet verwijderd worden door wind of water. Adhesie kan zowel op de boven- als onderzijde van de appelbladeren gebeuren. De factoren die het vasthechtingsproces induceren en de samenstelling van het vasthechtingsmateriaal zijn verschillend naargelang de schimmel. Bij *V. inaequalis* hechten de ascosporen zich vast op natte hydrofobe oppervlaktes van de plant zoals de cuticula. De herkenning van het substraat is doorslaggevend om de plaats te bepalen waar appressoria het best gevormd worden. Deze herkenning wordt bepaald door topografische (vb. de aanwezigheid van stomata), chemische (vb. cutine monomeren) of omgevingsignalen (bv. hoge RH; Struck, 2006). De schimmel *V. inaequalis* zal de plant binnendringen via de cuticula, maar niet via de stomata (MacHardy, 1996). Vervolgens zullen de ascosporen kiemen, waardoor kiembuizen ontstaan. Voor de kieming van de sporen is de aanwezigheid van water op het bladoppervlakte noodzakelijk. Zolang de relatieve luchtvochtigheid meer dan 95 % bedraagt, zal kieming doorgaan (Turecheck, 2004). Een succesvolle infectie na kieming is ook afhankelijk van gunstige omgevingscondities zoals de aanwezigheid van vocht op het bladoppervlak, relatieve luchtvochtigheid, temperatuur en licht waarbij de basis gegeven werd door de curven van Mills en LaPlante. Dit betekent dat een sporenkieming niet altijd tot een infectie van de plant leidt (Cammue, 2016). Indien de kiembuizen van de ascosporen in contact komen met de cuticula differentiëren ze in gespecialiseerde penetratie organen, namelijk appressoria of drukorganen (Jha *et al.*, 2009). Deze worden gevormd aan de top van de kiembuizen van de sporen en ze produceren

extracellulair slijm om de vasthechting op het plantoppervlak te vergemakkelijken. Appressoria creëren een hoge turgordruk door glycerol accumulatie, waardoor actieve penetratie van het plantenweefsel met een primaire penetratiehyfe mogelijk wordt met behulp van cuticula- en celwand degraderende enzymen (Struck, 2006). Deze penetratiehyfe ontstaat aan onderkant van het appressorium en is omgeven door het ingesloten plant plasmamembraan. De melanine in de celwanden van een appressorium zijn noodzakelijk voor het creëren van deze turgordruk. Een gemelaniseerde celwand is namelijk ondoordringbaar voor glycerol en de productie van hoge glycerolconcentraties (meer dan 3 M) in het appressorium zorgen voor een turgordruk die kan oplopen tot 8 MPa (Howard *et al.*, 1991). Melanine komt vooral voor als melanoproteïne en wordt geproduceerd door *V. inaequalis*. Het wordt verondersteld om *cell wall degrading enzymes* (CWDE) zoals cutinasen te binden en hun trage vrijzetting uit celwand te vergemakkelijken (Jacobson, 2000). Verder helpt het melanoproteïne om de opgeloste nutriëntenstroom om te leiden naar infectieplaatsen, waarschijnlijk door de membraanpermeabiliteit en het transportsysteem van appel te wijzigen, om de beschikbaarheid van nutriënten voor de groei en ontwikkeling van pathogenen te vergemakkelijken (MacHardy, 1996).

De cuticula van de plant is opgebouwd uit cutine, waardoor degradatie van cutine door enzymen dus beslissend is voor de pathogeniciteit van de schimmel. Hierbij wordt cutinase verondersteld het sleutelenzyme te zijn in het penetratie proces van de schimmel (Knogge, 1996). Cutinasen bestaan uit serine (Ser) esterasen die zorgen dat de cutine polymeren in de waslaag van de cuticula gehydrolyseerd worden en oplossen (Longhi & Cambillau, 1999). Extracellulaire cutinasen worden door kiemende conidia en het mycelium geproduceerd. Daarnaast wordt de celwand van de plant ook afgebroken door het uitscheiden van cellulasen, xylanasen, pectines en proteasen (Walton, 1994; Annis & Goodwin, 1997). *V. inaequalis* zou enkel cutinasen en een kleine hoeveelheid aan pectinasen uitscheiden bij de plaats van penetratie (Xu & Mendgen, 1997; Raa, 1968). Celwand degraderende enzymen kunnen naast het doorbreken van de cuticula van de plant, en dus de penetratie van de schimmel vergemakkelijken, ook gelijktijdig het plant immuunsysteem stimuleren. Hierdoor zorgt de schimmel voor een gecontroleerde vrijgave van CWDE om zo de inductie van verdedigingsmechanismen van de plant te beletten. Degradatie van homogalacturonan leidt tot de productie van oligogalacturoniden als potentiële primers tijdens verdedigingsmechanismen tegen pathogenen. Deze stelling zal getest worden in deze thesis. Tot slot groeit de penetratiehyfe verder tot een infectiehyfe die zich een weg baant onder de cuticula en zich op die manier verder zal verspreiden in het bladweefsel. Tijdens de biotische fase van de pathogeen

blijft de protoplast van de plant leven en een matrix zal de protoplast van de schimmel en de plant van elkaar scheiden. Na een succesvolle penetratie zal de pathogeen de plant koloniseren door secretie van fytotoxines of planthormonen die de fysiologie van de plant zodanig zal manipuleren in het voordeel van de pathogeen. Dit proces kan simpelweg bestaan uit de celwanden van de plant af te breken door grote hoeveelheden van celwand afbrekende enzymen vrij te geven, afkomstig van secundaire infectiehyfen om zo nutriënten te kunnen opnemen. Hierdoor zal één tot twee dagen na de penetratie het plasmembraan van de plant desintegreren. Sommige (hemi)biotrofen waaronder *V. inaequalis* hebben nood aan gespecialiseerde structuren zoals haustoria om na het binnendringen van de cuticula, subcuticulair nutriënten te gaan onttrekken. Haustoria ontstaan na contact van een infectiehyfe met een gastheer celwand. Verder kan de aanwezigheid van nutriënten op het blad ook de groei van de pathogeen stimuleren (Struck, 2006). Zo kan *V. inaequalis* goed groeien op groeimedia die sucrose (Suc), glucose (Glu) of fructose (Fru) bevatten (Boone, 1971), waardoor exogene suikerbehandelingen op appelplanten een positieve invloed zou kunnen hebben op de groei van deze schimmel. Dit zal verder onderzocht worden in deze thesis via drie experimenten.

3. Verdedigingsmechanismen van de plant tegen biotische stress

De ontwikkeling van een ziekte is gesteund op de interactie tussen drie componenten, namelijk pathogeen, gastheer en omgeving. Indien één van deze factoren van de ziektedriehoek ongunstig is, kan een plant aan een ziekte ontsnappen. Zo kan een pathogeen bijvoorbeeld met een voorkeur voor jonge planten niet infecteren op planten met ouderdomsresistentie. Ziekteresistentie en gevoeligheid van de plant worden bepaald door de genen van de plant en de pathogeen alsook door de complexe signalen en mechanismen om deze genen te activeren. Zo zal het resistentiegen *Rvi6* in de appelplant geen geslaagde infectie van *V. inaequalis* toelaten. Resistentie bestaat enerzijds uit echte of anderzijds uit schijnbare resistentie. Echte resistentie tegen plant pathogenen verwijst naar het vermogen van de gastheer om het ziekteverwekkend effect van de pathogeen volledig of quasi volledig te weerstaan zodat geen tot weinig symptomen tot uiting komen bij de plant (Cammue, 2016). Deze echte resistentie kan twee vormen aannemen in planten, namelijk horizontale en verticale resistentie (Cammue, 2016). Een horizontale resistentie is polygeen en is niet specifiek tegen een bepaald ras van de pathogeen. Hierdoor is deze resistentie moeilijker te doorbreken door pathogenen. Verticale resistentie daarentegen is mono- tot oligogeen en is specifiek tegen een bepaald ras van de pathogeen, waardoor resistentie gemakkelijker doorbroken kan worden door pathogenen.

Daarnaast is de graad van resistentie afhankelijk van het aantal initiële infecties. Naast echte resistentie is er ook schijnbare resistentie of tolerantie van de plant tegenover pathogenen. Tolerantie verwijst naar het vermogen van de gastheer om het ziekteverwekkend effect van de pathogeen gedeeltelijk te overkomen, waardoor slechts beperkte symptomen waar te nemen zijn op de plant. Deze vorm van resistentie is in feite meer gewenst dan echte resistentie aangezien planten met een schijnbare resistentie tegen pathogenen minder last zullen ondervinden van de symptomen en dus tot minder opbrengstverliezen zullen leiden.

3.1. Geïnduceerde verdediging

Tijdens de lange co-evolutie tussen pathogenen en hun gastheer hebben planten verschillende mechanismen ontwikkeld om een pathogeenaanval af te weren. Sommige van deze mechanismen zijn reeds gevormd, terwijl andere pas geïnduceerd worden op het moment van de aanval door de pathogeen zelf (Yang *et al.*, 1997).

3.1.1. PAMP-getriggerde immuniteit

Planten bezitten een niet-gastheer alsook een gastheer immuniteit. De algemene regel bij resistentie van planten is dat de plant resistent is tegen de meeste pathogeen-species. De meeste planten zijn dus geen gastheer voor verschillende pathogenen. Deze niet-gastheer immuniteit is een evolutionair mechanisme dat gebruikt wordt door de meeste pathogenen. Het is geassocieerd met de herkenning van afgeleide moleculen van de pathogeen zoals een toxine of afbraakproducten van de plant die gevormd worden tijdens de plant-pathogeen interactie en op die manier dus de aanwezigheid of activiteit van de pathogeen verraden aan de plant. Deze elicitors kunnen dus afkomstig zijn van de pathogeen of van de plant zelf. Als elicitors hun oorsprong vinden bij pathogenen worden deze *Pathogene-Associated Molecular Patterns* (PAMP's) of *microbe-associated molecular patterns* (MAMP's) genoemd. Deze zijn evolutionair geconserveerd in micro-organismen. De plant beschouwt deze elicitors als niet-eigen moleculen en worden herkend door een groot aantal gastheren. De celwand van schimmels is opgebouwd uit chitine dat bijgevolg een abundant molecule is en daarom wordt gerekend tot de belangrijkste PAMP's van schimmels die door planten gedetecteerd kunnen worden. Chitine is een lineair β -(1,4) N-acetylglucosamine gelinkte polymeer dat afgebroken kan worden door chitinasen uitgescheiden door de plant (Bueter *et al.*, 2013). Nadat chitine aan zijn chitine elicitor receptor kinase 1 (CERK1; Miya *et al.*, 2007) gebonden is, induceert deze een intracellulaire signaalweg via de nucleus door activatie van verdedigingsresponsen via *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK's), productie van *Reactive Oxygen Species* (ROS)

en accumulatie van fytoalexines en lignineproductie (Kawano & Shimamoto, 2013; Macho & Zipfel, 2014). Indien de elicitoren afkomstig zijn van planten, worden deze *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMP's) genoemd. Dit zijn componenten afkomstig uit de celwand van de plant. De plant beschouwt deze moleculen als moleculen die niet vrijkomen bij eigen activiteiten. Oligalacturoniden (OG'n) zijn goed bestudeerde DAMP's en binden met *Cell wall-associated kinase* (WAK) receptoren die afhankelijk van de ketenlengte een verschillende signaalweg zullen activeren via MAPK3 of MAPK6 (Ferrari *et al.*, 2007; Kohorn & Kohorn, 2012; Ferrari *et al.*, 2013). Deze receptoren bevatten een EGF domein. Recent worden ook fructanen tot DAMP's en MAMP's gerekend en kunnen ze immuunreacties induceren afhankelijk van het pathosysteem¹ (Versluys *et al.*, 2017). In paragraaf 4.3.2 (Fructanen als DAMP of MAMP) wordt dit uitgebreid besproken.

Vervolgens worden elicitoren herkend door *pattern recognition receptors* (PRRs). PRRs zijn transmembranaire *Receptor-like kinases* (RLK's). RLK's en *Receptor-Like proteins* (RLP's) bevatten een extracellulair ligandendomein waarmee ze met PAMP's kunnen binden (Trouvelot *et al.*, 2014). Binnen in de cel bevatten de RLK's een intracellulaire kinasendomein dat de interne cascaderactie activeert, waar de proteïne varianten (RLPs) dit kinasendomein missen en dus een associatie moeten aangaan met andere proteïnen om deze cascaderactie te verwezenlijken (Monaghan & Zipfel, 2012; Böhm *et al.*, 2014). Een transmembranair domein bij de RLK's verbindt het intracellulaire kinasendomein met het extracellulaire PAMP herkenningsdomein. Het extracellulair PAMP herkenningsdomein bestaat typisch uit een *leucine rich repeat* (LRR) of *Lysin Motif* (*LysM*) domein (Trouvelot *et al.*, 2014). Een LRR domein bevat vier geconserveerde leucine residuen met daarnaast nog 20-30 aminozuren die telkens herhaald worden. Het *LysM* domein bindt moleculen die N-acetylglucosamine bevatten zoals peptidoglycaan en chitine. Indien PAMP's binden met het extracellulaire uiteinde van RLK's zal het intracellulair domein een signaal voortbrengen in de cel (Monaghan & Zipfel, 2012; Böhm *et al.*, 2014). Deze signalen induceren productie van ROS en MAPK cascades die op hun beurt de WRKY familie van transcriptiefactoren (TF'n) activeren (Pandey & Somssich, 2009). Met hun geconserveerd WRKYGQK gebied en een uniek Zink vingerpatroon van Cys en His residuen binden ze met DNA en interageren ze met het W-box motief in promotors en genen die de expressie van vroege afweer gerelateerde genen stimuleren (Rushton *et al.*, 1996; Ishihama en Yoshioka, 2012). Door de herkenning van MAMP's of DAMP's door de plant is

¹ Een pathosysteem is een subsysteem van een ecosysteem en is gebaseerd op parasitisme. Het bestaat uit de gastheer (plant), parasitiet (schimmel) en de omgeving (Robinson, 1976).

de plant niet meer vatbaar voor de pathogeen en is deze niet meer virulent. Virulentie is de graad van pathogeniciteit of het vermogen om een ziekte te veroorzaken door een parasiet. Deze eerste gordel van plantverdediging wordt *PAMP-triggered immunity* (PTI) genoemd (Ausubel, 2005). Dit is een eerste geïnduceerde afweerrespons waarbij eerst de pathogeen wordt gedetecteerd, daarna signalisatie en tot slot geïnduceerde resistentie van de plant volgt. Hierbij blijven de verdedigingsreacties onder de drempelwaarde voor een hypersensitieve reactie (HR).

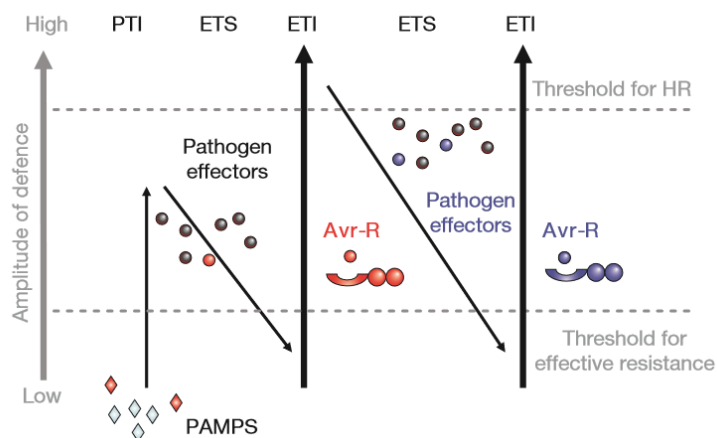
3.1.2. Effector-getriggerde gevoeligheid

Virulente pathogenen kunnen het PTI verdedigingsmechanisme echter omzeilen door effectoren of avirulentie (Avr) proteïnen te secreteren en te transporteren in de plantencel die deze signaalweg en zo ook de PTI immuniteit blokkeren. Dit mechanisme wordt *Effector-Triggered Susceptibility* of ETS genoemd. Deze effectoren zorgen er dus voor de plant terug gevoelig wordt voor de pathogeen. Sommige effectoren hebben een structurele rol o.a. in de extrahaustoriale matrix bij biotrofe schimmels en oömyceten (Schulze-Lefert & Panstruga, 2003), waar andere zorgen voor het vrijkomen van nutriënten of het verspreiden van de pathogeen (Badel *et al.*, 2002). AvrRpt2 is een voorbeeld van een effector dat bindt met het *resistance to Pseudomonas Syringae pv. Maculicola 1* (RPM1) *Interacting Protein 4* (RIN4) in het plasmamembraan, wat een verhoogde virulentie veroorzaakt bij de afwezigheid van het *resistance to Pseudomonas Syringe 2* (RPS2) *R* proteïne in de plant (Jones & Dangl, 2006). De meeste effectoren zijn er echter op gericht om een of meerdere componenten in de PTI of ETI (zie volgende paragraaf) reactie te neutraliseren. Een plant kan ook vatbaar en dus gastheer geworden zijn voor een specifiek pathogeen-species, maar kan resistent geworden zijn tegen een aantal rassen van die pathogeen. Deze gastheer immuniteit is specifiek gericht tot bepaalde genotypen die vatbare gastheer species bevatten voor de pathogeen.

3.1.3. Effector-getriggerde immuniteit

Als gevolg van de co-evolutie tussen planten en pathogenen ontstond een volgend geïnduceerde afweerrespons, namelijk het effector-triggered immunity (ETI; Jones & Dangl 2006; Chisholm *et al.* 2006). Hierbij gebruiken resistente planten de effectoren in hun voordeel. Zij beschikken over resistentie genen (*R* genen) die coderen voor *R* proteïnen die in staat zijn de uitgescheiden effectoren te herkennen (zie Fig. 5). Opnieuw resulteert dit mechanisme in een immuniteit voor de plant tegen de pathogeen, wat ook gepaard gaat met de inductie van HR. De meeste van deze *R* genen hebben een nucleotide binding (NB) plaats en een *LRR* domein. De *LRR*'s lijken

met behulp van een negatieve regulatie ervoor te zorgen dat ongepaste moleculen niet met het NB domein kunnen binden (Jones & Dangl, 2006). De N-terminus van het NB-LRR proteïne bevat over het algemeen een *Coiled-Coil* (CC) domein of een Toll-Interleukine-1 Receptor (TIR) domein. De binding met Avr proteïnen induceert conformatieveranderingen in het R proteïne door de uitwisseling van ATP/ADP in het *LRR* domein. Deze conformatieverandering in het N-uiteinde zorgt voor de overdracht van een intracellulair signaal, wat leidt tot het activeren van afweer gerelateerde genen met ETI tot gevolg. Om deze twee plantimmuniteiten samen te brengen, werd het zigzagmodel opgesteld om onze huidige kennis over het geïnduceerde immuunsysteem samen te vatten (zie Fig. 5). In de eerste fase zal een PAMP herkend worden door een PRR, wat leidt tot PTI, waardoor verdere verspreiding van de pathogeeninfectie verhinderd zal worden. Vervolgens zullen succesvolle pathogenen effectoren secreteren die op hun beurt PTI zullen inhiberen. Dit mechanisme wordt ETS genoemd. De plant zal dankzij evolutie proteïnen ontwikkelen die deze effectoren kunnen herkennen, wat opnieuw leidt tot immuniteit van de plant, dit is beter gekend onder de naam ETI. Tot slot kan een pathogeen via mutaties of horizontale genenvermenging nieuwe effectoren (zie Fig. 5) verkrijgen die de pathogeen helpen om ETI terug te onderdrukken. Zo produceren ze bijvoorbeeld kleine effectormoleculen die planthormonen nabootsen. Hierdoor is de plant nogmaals gevoelig via ETS. Gedreven door natuurlijke selectie worden nieuwe *NB-LRR* genen geselecteerd die nieuwe effectoren kunnen binden, wat opnieuw zal resulteren in een immuniteit voor de plant via ETI (Jones & Dangl, 2006). Als tegenreactie van de pathogeen zal weeral ETS volgen met daarna terug ETI. Deze cycli van het ontstaan en doorbreken van resistentie blijven elkaar opvolgen.



Figuur 5: Schematische voorstelling van de verschillende genetische verdedigingsmechanismen van de plant als reactie op een pathogeeninfectie door middel van het zigzagmodel (Jones & Dangl, 2006).

PTI en ETI verschillen niet alleen in hun mechanisme van pathogeenherkenning, maar ook in hun responsen om infectie te voorkomen. ETI werkt bij voorkeur bij lage temperaturen (10-23°C) terwijl PTI bij hogere temperaturen (23-32°C) werkzaam is (Cheng *et al.*, 2013). Bij een koude lente zal PTI onvoldoende werken, waardoor het gewas een groter risico heeft op infectie volgens de weercurven van Mills en LaPlante. Als PAMPs herkend worden, kunnen deze responsen zich binnen enkele uren voordoen. Dit in tegenstelling tot ETI waarbij de signalen pas twee dagen na infectie (dpi) geactiveerd worden. Hoewel ETI een visuele responsreactie veroorzaakt om de pathogeen af te weren via lokale geprogrammeerde celdood (PCD) met behulp van necrotische zones, is deze HR niet terug te vinden bij PTI. Tot slot is het onderscheid tussen PTI en ETI niet altijd even duidelijk.

3.1.4. Signaaltransductie en transcriptie na herkenning

Indien PAMP's of Avr proteïnen van de pathogeen herkend worden door respectievelijk PRR's of R proteïnen van de plant moet een interngerichte signaalweg geactiveerd worden, wat leidt tot de inductie van het plant immuunsysteem. Een verhoogde Ca^{2+} concentratie in het cytosol, accumulatie van salicylzuur (SA), inductie van ethyleen (ET), biosynthese van stikstofmonoxide (NO), de productie van ROS moleculen en MAPK componenten spelen hierbij een belangrijke rol (Tena *et al.*, 2011; Nikraftar *et al.*, 2013; Stael *et al.*, 2015).

Bij PTI zorgt een initiële verdedigingsrespons (0.5-2 min na herkenning van de pathogeen) voor een verhoogde H^+ en Ca^{2+} concentratie en een verlaagde K^+ concentratie in het cytosol, wat membraandepolarisatie bevordert (Savatin *et al.*, 2014). Deze verhoogde Ca^{2+} concentratie is een kritische stap bij PTI. De Ca^{2+} wordt voornamelijk apoplastisch opgenomen uit de celwand, maar kan ook intracellulair aangevoerd worden door de vacuole en het endoplasmatisch reticulum tijdens een pathogeen infectie (Bush, 1995). De plant kan verschillende calciumsignalen van elkaar onderscheiden door verschillende Ca^{2+} binding proteïnen zoals calmoduline, calcineurine *B-like* proteïnen en calciumafhankelijke proteïne kinasen (CDPK's; Reddy & Reddy, 2004). Deze CDPK's worden gezien als belangrijke schakels voor een vroegtijdige PTI signalisatie (Boudsocq *et al.*, 2010). Een verhoogde Ca^{2+} concentratie activeert eveneens verschillende TF'n, waarvan sommige enkel tijdens biotische stress worden geïnduceerd. Calmoduline binding transcriptie activator 3 (CaMTA3), sommige WRKY en TGA TFs en *CaM Binding Protein 60* (CBP60) zijn allemaal betrokken in de modulatie van de plant verdedigingsresponsen (Tena *et al.*, 2011). Naast membraandepolarisatie en transcriptie zorgt Ca^{2+} ook voor de productie van ROS moleculen en NO (Vidhyasekaran, 2014c). De productie van ROS en Reactieve Stikstof Intermediären

(RNI'n) in de celwand van de plant zijn één van de eerst meetbare veranderingen betrokken bij plantafweer tegen pathogenen. De volledige synthese reactieweg van RNI'n is nog onbekend, maar ze zouden door hun negatief terugkoppelingseffect op het NADPH oxidase een HR tegenhouden door de inhibitie van de ROS synthese (Yun *et al.*, 2011). De meest voorkomende ROS moleculen zijn superoxiden ($O_2^{\bullet-}$), waterstofperoxiden (H_2O_2) en hydroxyradicalen (OH^{\bullet} ; Demidchick, 2015). OH^{\bullet} is het meest reactief en ook het meest schadelijk aangezien het reageert met DNA, membraanlipiden en proteïnen. Desondanks de schade die ze aanrichten, hebben $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 ook een belangrijke signaalfunctie in de cel. Te hoge niveaus van deze moleculen worden echter belet door antioxiderende enzymen zoals catalasen (CAT'n), superoxide dismutasen (SOD'n) en niet enzymatische proteïnen zoals glutaminylcysteinyglyceïne (GSH; Mittler, 2002). In appel zijn vooral fenolen en vitamine C belangrijke antioxidanten (Lee *et al.*, 2003). Petkovsek *et al.* (2007) beschreef dat fenolen en meer specifiek flavanolen omhoog gereguleerd worden als reactie van de plant op een infectie met de schimmel *V. inaequalis*. Zo neemt Petkovsek *et al.* (2011) een zesvoudige stijging waar van flavanolen en chlorogeenzuur. Ook worden ROS beschouwd als antimicrobiële moleculen door hun direct effect op pathogenen enerzijds en door hun celwand verstevigende oxidatieve *cross linking* van fenolen, hun invloed op de HR, hun inductie van intracellulaire reactiewegen zoals SA synthese, en hun activatie van MAPK cascades anderzijds (Lamb & Dixon, 1997; Schweikert *et al.*, 2000; Demidchik & Maathuis, 2007). MAPK signalering is ook betrokken in verschillende biotische stress responsen en SA accumulatie (Tena *et al.*, 2011).

De ETI verdedigingsreactie overlapt voor een deel met die van PTI. Het gedeeltelijk overlappen van beide immuniteiten impliceert dat ze hetzelfde interngericht signaalmechanisme delen zoals SA, ET en jasmonaat (JA) geïnduceerde reacties (Mishina & Zeier, 2007; Tsuda *et al.*, 2008). Enkele verschillen tussen PTI en ETI werden hierboven al vermeld, maar er zijn ook verschillen terug te vinden in o.a. MAPK cascades. Een infectie van *B. cinerea* leidt tot de productie van plant defensines zoals PDF1.1 en PDF1.2 en wordt geholpen door MPK3/6 geïnduceerde ethyleen respons factor 1/6 (ERF1/6) activatie. Volgens Galletti *et al.* (2011) en Meng *et al.* (2013) is MPK3 belangrijker in PTI terwijl MPK6 een meer uitgesproken rol heeft in ETI. Het grootste verschil tussen ETI en PTI is echter afhankelijk van de SA levels. SA concentraties variëren tussen de infectieplaats en de omliggende weefsels. In de omliggende weefsels rond de infectie wordt de *Non-expressor of Pathogenesis-Related protein* (NPR) NPR1-NPR4 interactie niet onderbroken door lage SA levels. Hierdoor degradeert NPR1 niet en kan het niet interageren met TF'n om zo de expressie van PR proteïnen te activeren (Fu & Dong, 2013; Veloso *et al.*, 2014; Janda & Ruelland, 2015). Dit zal leiden tot

inhibitie van de HR (Shah & Zeier, 2013; Hayward *et al.*, 2009). Het NPR1 proteïne is een sleutel transcriptie co-activator van SAR waarbij een overexpressie in *Arabidopsis* leidde tot een verhoogde PR gen activatie en immuniteit (Spoel *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 1998; Charn *et al.*, 2005). De nucleaire NPR1 concentratie wordt gecontroleerd door SA levels via de SA receptor proteïnen NPR3 en NPR4. NPR4 heeft een hoge affiniteit voor SA, terwijl NPR3 een lage affiniteit heeft voor SA (Moreau *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2012). Lage SA levels verminderen de NPR1 degradatie, terwijl hoge SA levels deze degradatie verhogen. Hoge SA levels in lokaal geïnfecteerd weefsel binden met de hoge affiniteitsreceptor NPR4, waardoor de NPR1-NPR4 interactie verstoord wordt, maar de NPR1-NPR3 interactie gepromoot wordt. Hierdoor degradeert NPR1 en kan het SA afhankelijke verdedigingsgenen induceren, wat uiteindelijk zal leiden tot een HR en dus het activeren van SAR (Shah & Zeier, 2013). Hierbij zal onder invloed van proteasoom subeenheden het plasmamembraan versmelten met de tonoplast om daarna antimicrobiële proteïnen in de apoplast vrij te geven. Buiten antimicrobiële proteïnen bevat de uitgescheiden extracellulaire vloeistof ook gradueel en traag celdood inducerende componenten. Dit zal ook lokale celdood en *Systemic Acquired Resistance* (SAR) stimuleren om verdere verspreiding van de pathogeen te limiteren (Hatsugai *et al.*, 2009).

3.1.5. Systemisch verworven resistentie

Indien de plant PAMPs of het pathogene *Avr* gen herkent via respectievelijk PRRs of een compatibel R proteïne zal resistentie tegen de pathogeen verworven zijn. Dit proces gaat meestal gepaard met HR. Hierbij wordt eerst een massale accumulatie van bijvoorbeeld fytoalexines (Osborn, 1996) en *Pathogenesis Related* (PR) proteïnen (Bowles, 1990) opgebouwd waarna de inductie van een gecontroleerde en geprogrammeerde celdood in planten volgt. Tot slot worden deze antimicrobiële componenten vrijgeven bij de infectieplaats, wat zal leiden tot een verminderde verspreiding van de pathogeen. Deze respons is niet efficiënt tegen necrotrofen. Het heeft een lokaal effect en kan dus de verdere verspreiding van de pathogeen tegenhouden. ROS is samen met NO betrokken in de HR. Anderzijds kan ook een derde resistentie mechanisme geïnduceerd worden in niet geïnfecteerde plantenweefsel, namelijk systemisch verworven resistentie. Deze zorgt in de plant voor een systemische, langdurige en brede ziekteresistentie die erop gericht is de plant minder vatbaar te maken voor toekomstige pathogeeninfecties (Mou *et al.*, 2003). SAR leidt tot inductie van allerlei defensiegenen. Het induceren van een SAR signaal vergt een endogene accumulatie van SA die leidt tot transcriptionele herprogrammering van verschillende genen betrokken bij de expressie van PR proteïnen (Van Loon *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2007). Deze PR proteïnen zullen vervolgens

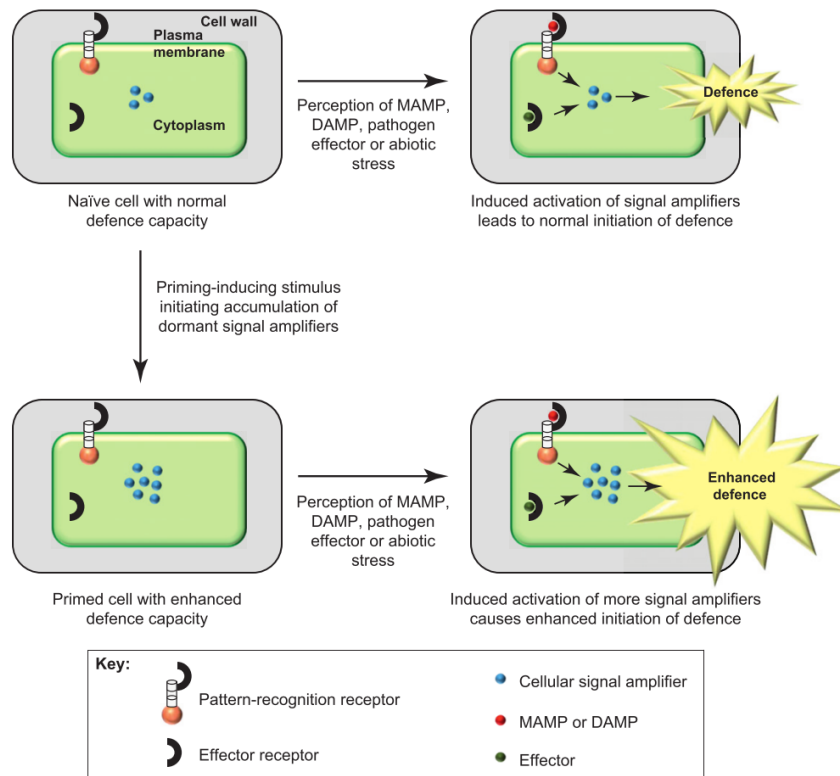
verdedigingsreacties opwekken in de plant. Naast accumulatie van SA is er ook nood aan mobiele elementen die getransporteerd worden van het geïnfecteerde naar het niet-geïnfecteerde weefsel. De productie van Glu-3-fosfaat (G3P), dehydroabietinal (DA), *azelaic acid* (AzA), *pipecolic acid* (Pip) en methyl salicylzuur (MeSA) worden omhoog gereguleerd in de geïnfecteerde bladeren. Deze mobiele signalen werden vervolgens systemisch getransporteerd naar de andere weefsels. DA, AzA en Pip kunnen indirect de SA biosynthese induceren door een positieve feedback waarbij flavine monooxygenase 1 (FMO1) en *ADP ribolysation factor GTPase-activating protein-Like Defense protein 1* (ALD1) bij betrokken is. *Defective in Induced Resistance protein 1* (DIR1), een lipide transfermolecule, is essentieel gebleken in het lange afstandstransport van de signaalmoleculen en dus ook in een SAR inductie (Maldonado *et al.*, 2002). SAR is effectief tegen een breed spectrum van pathogenen. SAR is niet enkel induceerbaar door pathogenen, maar ook door chemische componenten zoals β -aminobutyric acid (BABA; Cohen, 2002).

Een tweede vorm van resistentie is geïnduceerde systemische resistentie (ISR). Hierbij kunnen biocontrole organismen (bv. *Pseudomonas fluorescens*) de plant triggeren tot een systemische en hogere regulatie van de verdedigingsgenen (Smith *et al.*, 2009). In vergelijking met SAR, wat effectief is tegen biotrofen, draagt ISR voornamelijk bij tot de resistentie tegen necrotrofen (Pieterse & Dicke, 2007). ISR vereist geen SA, maar maakt gebruik van JA en ET.

3.2. Priming

Priming is een cruciaal proces in verschillende types van systemische plant immuniteitsresponsen (Conrath *et al.*, 2002; Conrath *et al.*, 2006; Conrath *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2009). Priming kan beschreven worden als een fysiologisch proces dat planten laat reageren op lage niveaus van stimuli met een snellere en sterkere geïnduceerde verdedigingsrespons bij toekomstige biotische of abiotische stressen (Conrath 2011; Bolouri-Moghaddam & Van den Ende 2012). Priming agentia induceren niet onmiddellijk de verdedigingsresponsen van de plant, maar zorgen voor een verbeterde perceptie en amplificatie van de geïnduceerde responssignalen bij een toekomstige pathogeenaanval. De verdedigingsreacties van geprimeerde planten zijn sneller in vergelijking met deze van niet geprimeerde verdedigingsreacties, omdat de verdedigingsgenen bij geprimeerde planten al op voorhand omhoog of omlaag gereguleerd werden (zie Fig. 6; Espinas *et al.*, 2016). De planten worden als het ware in een “ready to go” staat gebracht. Deze verhoogde staat van paraatheid zou volgens Slaughter *et al.* (2012) transgenerationeel zijn. Zo is ontdekt dat de nakomelingen van geprimeerde planten een verhoogde expressie van verdedigingsgenen vertoonden vergeleken

met de nakomelingen van niet geprimeerde planten. Bijgevolg vereist deze techniek minimale hoeveelheden van ATP van de plant, waardoor de groei van de plant niet wordt belemmerd. Priming is een deel van zowel SAR als ISR (Goellner & Conrath, 2008).



Figuur 6: Priming door Conrath (2011) in planten. Een priming geïnduceerde stimulus verhoogt het cellulaire niveau van inactieve proteïnen met een belangrijke rol in cellulaire signaalversterking. een daaropvolgende blootstelling aan MAMP's, DAMP's, pathogeen effectoren of abiotische stress zal meer van deze signaalproteïnen activeren in vergelijking met niet geprimeerde cellen, wat leidt tot een snellere en sterkere activatie van het verdedigingsmechanisme.

Het mechanisme van priming kan verklaard worden door de interactie tussen de verschillende verdedigingssignaalwegen (Pastor *et al.*, 2012). Hierbij zijn eigenschappen zoals beschikbaarheid en betrokkenheid van nauwkeurige signaalwegen bepalend. Zo is priming gebaseerd op een verhoogde accumulatie van receptoren en verdedigingsregulerende proteïne kinasen die een tweede posttranslationele modificatie vereisen om actief te worden tegen toekomstige aanvallen van pathogenen. Na priming wordt een accumulatie van MPK3 en MPK6 componenten waargenomen (Conrath, 2009; Aranega-Bou *et al.*, 2014). Deze signaal proteïnen zijn ook actief bij responsroutes van hormoon inducerende verdedigingsreacties. Verder werd door Conrath *et al.* (2015) ook bewezen dat cruciale TF'n voor de inductie van verdedigingsgenen zoals WRKYs geaccumuleerd worden naar hogere levels in geprimeerde planten. Priming werd ook geassocieerd met de modificatie van histonen bij

verdedigingsgerelateerde promotors die zo de toegang vergemakkelijken van deze promotors voor het transcriptiecomplex (Jaskiewicz *et al.*, 2011). Dergelijke epigenetische veranderingen zijn overerfbaar en hebben hun effect op de genexpressie en bijgevolg ook op het immuunsysteem van de plant (Molinier *et al.*, 2006).

Priming kan geïnduceerd worden door chemische componenten zoals SA, Pip of JA, pathogenen, insecten, herbivoren, mutaties in afweer gerelateerde genen of omgevingsignalen die leiden tot een verhoogde kans op een pathogeeaanval (Hilker *et al.*, 2015; Conrath *et al.*, 2015). SA zorgt voor priming van planten, waardoor een verhoogde inductie van verdediging bekomen wordt en activeert rechtstreeks de systemische immuniteit in de plant via SAR (Thulke & Conrath, 1998; Ward *et al.*, 1991). Hoewel SAR niet altijd gecorreleerd is met systemische accumulatie van SA (Cameron *et al.*, 1999), is ze dit wel (Jung *et al.*, 2009) met het secundaire metaboliet AzA. Ook worden JA, systemine, azelaic zuur en Pip als onmisbaar beschouwd voor systematische priming via SAR. Priming kan ook getriggerd worden door organismen zoals niet pathogene rhizobacteriën en mycorrhizae die een ISR induceren (van Wees *et al.*, 2008). ISR gerelateerde priming is geassocieerd met priming door JA afhankelijke verdediging (Verhagen *et al.*, 2004; Pozo *et al.*, 2008; van der Ent *et al.*, 2009). Natuurlijke componenten zoals oligosacchariden, vitaminen en aromaten hebben de neiging beter door de plant getolereerd te worden dan synthetische componenten. De lage toxiciteit maken natuurlijke componenten meer bruikbaar in de praktijk als potentiële primingcomponenten (Aranega-Bou *et al.*, 2014). Recent werden levanen voorgesteld als primingsuikers die PAMP getriggerde immuniteit kunnen activeren (Versluys *et al.*, 2017). Deze techniek wordt zoete priming genoemd. Indien priming zou zorgen voor verhoogde endogene suikerconcentraties in de plant dan zullen planten meer verdediging moeten bieden tegen *high sugar diseases*. Deze zijn namelijk bevoordeeld bij hoge suikercondities. Anderzijds zullen meer *low sugar diseases* voorkomen bij planten indien priming zou leiden tot lagere endogene suikerconcentraties.

3.2.1. Verdedigingsgenen

Om lagere sporulatiegraden van *V. inaequalis* bij appelplanten te bekomen via priming, is het ook interessant om genen betrokken in dit priming proces te bestuderen. Biotische en abiotische stress in eukaryoten activeert *mitogenactivated protein kinase* (MAPK) cascades. Planten hebben een groot aantal MAPK componenten die hen toelaten controle te hebben over een breed spectrum van stress responsroutes (Zhang *et al.*, 2006). Tijdens biotische stress zullen transmembraan patroonherkenningsreceptoren zoals FLS2 bacteriële flagelline MAMP's

detecteren in de protoplast van *Arabidopsis thaliana* (Asai *et al.*, 2002) die vervolgens MAPK cascades zullen triggeren om het signaal van de pathogeenrespons te amplificeren (Nakagami *et al.*, 2004; Chinchilla *et al.*, 2007). Deze MAPK cascade was opgebouwd uit MPKKK1, MPKK4/5 en MPK3/6. Signaal amplificatie wordt bereikt door drie functioneel gelinkte types van *Mitogen-activated protein kinase* (MPK's): een MAP kinase kinase kinase (MAPKKK), een MAP kinase kinase (MAPKK) en een MAP kinase. Als reactie op een signaal van een receptor zal MAPKK geactiveerd worden door MAPKKK via fosforylatie van Ser en Ser/threonine (Thr) residuen op het SXXXS/T motief waarbij X staat voor eender welk aminozuur. Vervolgens zal MAPKK, wat een tweezijdig specificiteit proteïne kinase is, MAPK activeren via fosforylatie van de Thr en tyrosine (Tyr) residuen op het interne TXY motief. Deze activatie kan ongedaan worden gemaakt met behulp van defosforylatie door Ser/Thr fosfatases, Tyr fosfatases (PTP's) of *dual specificity phosphatases* (DSP's; Keyse, 2000; Meskiene *et al.*, 2003). Daarna zal MAPK specifieke effectoren fosforyleren, wat uiteindelijk zal leiden tot de activatie van cellulaire verdedigingsresponsen. Targets van MAPK cascades omvatten TFs zoals deze in de WRKY familie en hormoon respons factoren zoals *ethylene insensitive 3* (EIN3; Andreasson & Ellis, 2010). WRKY22 en WRKY29 zijn twee transcriptie co-activatoren en spelen allebei een rol in de plant immuniteit (Eulgem, 2005). MAPK cascades kunnen geactiveerd worden door ROS productie zoals H₂O₂ die een cruciale rol spelen in de signaal *crosstalk*, maar ook deze ROS productie regelen (Apel & Hirt, 2004; Fujita *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2011). Signaal specificiteit van MAPK cascades wordt gecontroleerd door spatio-temporele beperkingen en proteïnen zoals *constitutive triple response protein 1* (CTR1) die bepaalde MAPK proteïnen kunnen vastbinden (Nakagami *et al.*, 2004; Andreasson & Ellis, 2010; Rodriguez *et al.*, 2010). MAPKs helpen ook in de regulatie van de NO synthese (Bellin *et al.*, 2013).

Het genoom van *Arabidopsis* codeert 20 MAP kinases, 10 MPKKS en meer dan 80 MPKKKs isovormen: slechts voor enkele is hun rol in de plantverdediging gekend of deels gekend (MAPK-Group, 2002). De speciale MAP kinase isovormen MPK3, MPK4, en MPK6 werden het meest uitgebreid bestudeerd. Blootstelling aan waterstofperoxide of PAMPs leidt bij planten tot een snelle activatie van de kinase activiteiten van MPK3, MPK4 en MPK6 (Ichimura *et al.*, 2006; Nakagami *et al.*, 2006; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2007). MAPK cascades zijn belangrijk om de *crosstalk* tussen stress responsen te controleren aangezien veel MAPK's geactiveerd worden door meer dan één type stress of plantenhormoon en dus in staat zijn om verschillende signalen te integreren (Rohila & Yang, 2007; Andreasson & Ellis, 2010). Bijvoorbeeld functioneert *Arabidopsis* MPK6 als reactie op ET synthese, koude- en zoutstress,

pathogeen signalering en stomatale celdeterminatie (Rodriguez *et al.*, 2010). Door hun sleutelrol in de signaalamplificatie zijn MPKs, MPKKS en MPKKKS uitstekende kandidaten voor cellulaire signaal enzymen die priming vergemakkelijken. Verhoogde gehalten van MPK3 en MPK6 transcript en proteïne werden gedetecteerd in de bovenste bladeren van *Arabidopsis* na primaire infectie van de onderste bladeren met de bacteriële pathogeen *Pseudomonas syringae* pv. Tomato strain DC3000 (Conrath *et al.* 2015). De grotere kwantitatieve activiteit van MPK3 en MPK6 in de geprimeerde planten was gelinkt met een verhoogde *phenylalanine ammonia-lyase 1 (PAL1)* en *PR1* verdedigingsgen activiteit en met de ontwikkeling van systemisch immuniteit in deze planten (Beckers *et al.*, 2009). In een studie van Beckers *et al.* (2009) waren priming en systemische immuniteit afwezig in het mutante *mpk3*, maar niet helemaal in het mutante *mpk6*. Dit duidt dus aan dat MPK3 een hoofdrol speelt in de geprimeerde verdedigingsgen activiteit, terwijl MPK6 slechts een bijrol uitoefent (Beckers *et al.*, 2009). Desalniettemin zijn beide MPKs vereist voor een volledige priming en systemische immuniteit in *Arabidopsis* (Beckers *et al.*, 2009). Onderzoek waarbij MPK6 zijn functie niet meer kon uitvoeren, toonde aan dat deze MPK vereist is voor het onderhouden van basale resistentie tegen een kwaadaardige bacteriële pathogenen en om volledige resistentie te activeren tegen avirulente bacteriële en oömycete pathogenen. MPK6 heeft dus wel degelijk zijn functie in het activeren van zowel lokale ziekteresistentie gereguleerd door specifieke *R* genen als de basale resistentie. De belangrijke rol van MPK3 en MPK6 in plantenimmuniteit wordt verder ondersteund door de ontdekking dat bepaalde plantenpathogenen hun effectoren lijken te gebruiken om defosforylisatie en dus inactivatie van MPK3 en MPK6 uit te voeren. HopA11 bijvoorbeeld is een effector en defosforyleert rechtstreeks *Arabidopsis* MPK3 en MPK6 en onderdrukt op die manier de immuniteit activiteit van deze MPKs. Kortom zal een hogere regulatie van MPK3 en MPK6 levels leiden tot verhoogde immuniteitsresponsen in *Arabidopsis*, terwijl een verminderde expressie van deze MPKs zal leiden tot een lagere verdediging tegen pathogenen. In *Arabidopsis* toonde transpositionele inactivatie van het *MPK4* gen verhoogde ziekteresistentie en constitutieve activatie van verdedigingsresponsen aan (Petersen *et al.*, 2000). MPK4 wordt dus verondersteld een negatieve regulator van SAR te zijn. Ondanks de vele analyses die consistent aantonen dat actieve componenten van de MAPK cascade belangrijk zijn bij plantenimmuniteit, moet dit toch met enige voorzichtigheid geïnterpreteerd worden. Blijvende activatie van MAPK cascade componenten kan leiden tot pleiotrofe effecten. Zo zal bijvoorbeeld een verlengde activatie van MAPKs in *Arabidopsis* resulteren in celdood door een intercellulaire H₂O₂ vorming (Ren *et al.*, 2002).

3.3. Interactie tussen *Venturia inaequalis* en appel

Planten hebben een set van genen ontwikkeld om resistentie responsen tegen pathogenen te activeren, namelijk *R* genen. Deze genen van de plant herkennen *Avr* genen van de pathogeen, waardoor verdedigingsmechanismen worden geactiveerd en de plant op die manier resistent wordt tegen de pathogeen. Deze vorm van interacties worden ‘gene-for-gene’ interacties genoemd en wordt gevolgd door de activatie van een *Venturia*-appel pathosysteem (MacHardy, 1996; Boone, 1971). Momenteel zijn er 17 verschillende *R*-*Avr* interacties beschreven tussen *Malus* en *V. inaequalis* met elk hun typische symptomen die waarschijnlijk gerelateerd zijn met de verschillende gen interacties en de interne signalen. Langs de andere kant kan deze verscheidenheid ook gelinkt zijn aan tot nog toe onbekende effectoren en hun specifieke rol die ze vervullen in de plant (Bowen *et al.*, 2011).

De schimmel *V. inaequalis* is genetisch niet uniform. Momenteel zijn er acht fysiologisch verschillende rassen van *V. inaequalis* gedefinieerd (MacHardy, 1996) waarbij ras 1 als referentie wordt beschouwd. Een appelcultivar is slechts resistent tegen een aantal rassen van *V. inaequalis* en omgekeerd geldt dus ook dat een bepaald ras van *V. inaequalis* maar een beperkt aantal appelcultivars kan infecteren. Deze verticale resistentie wordt gecontroleerd door één of enkele *R* gen(en). Onafhankelijke segregatie van *Avr* loci biedt het potentieel aan de pathogeen om nieuwe pathovormen te ontwikkelen tijdens de seksuele cyclus (Boone, 1971). Daarnaast kunnen nieuwe *Avr* genen ook ontstaan als gevolg van mutaties. Desalniettemin zijn sommige loci toch gelinkt met elkaar. De ontwikkeling van deze nieuwe *V. inaequalis* rassen kunnen virulent zijn op resistente cultivars tegen één enkel ras van deze pathogeen, aangezien de pathogeen de mogelijkheid heeft om zich aan te passen aan een specifieke gastplant. Het grootste deel van de gecultiveerde appelrassen zijn gevoelig voor appelschurft. Veredelingsprogramma’s voor resistentie tegen appelschurft werden gestart bij de ontdekking van een resistente appelkloon, namelijk *Malus floribunda* 821. Deze wordt beschouwd als een goede bron van natuurlijke resistentiegenen tegen appelschurft. Bij benadering zijn momenteel 19 *R* genen gelokaliseerd in het appelgenoom. Het meest gebruikte resistentiegen bij resistente rassen is het goed bestudeerde *Rvi6* (*Vf*) geïsoleerd uit de wilde appelcultivar *Malus floribunda* 821. Het gen homoloog tot *C. fulvus* *R* genen van de *Vf* region; syn. *Vfa2* (*HcrVf2*) wordt beschouwd als het echte *Vf* (*Rvi6*) gen, wat constitutief tot expressie komt in appel (Belfanti *et al.*, 2004; Xu & Korban, 2002; Vinatzer *et al.*, 2001; Szankowski *et al.*, 2009). Het *Rvi6* gen is gelegen op het eerste van de 17 homologe chromosoomparen of koppelingsgroepen (LG) bij appel (Bus *et al.*, 2005a). De symptomen verbonden aan dit *Rvi6* gen zijn chlorose en soms zeer beperkte sporulatie (Bus *et al.*, 2011). Enkele andere *R* genen werden geïsoleerd die

verschillende graden aan resistentie vertonen. Een voorbeeld is *Vd3* resistentiegen dat geïdentificeerd werd op *linkage group 1 (LG1)*, dicht bij het *Vf (Rvi6)* locus tussen de *CH-Vf1* en *67105F17* merkers (Soriano *et al.*, 2009). Bijna alle gekende *R* genen coderen voor proteïnen met leucinerijke herhalingen (Dangl & Jones, 2001). Het appel *leucine-rich repeat (LRR) receptorlike protein kinase1 (LRPKm1)* wordt geassocieerd met de appelverdediging tegen een *Venturia* infectie (Komjanc *et al.*, 1999). Dit gen vertoont een snelle en vroege inductie tijdens resistentie interacties. Sinds rassen 6 en 7 van *V. inaequalis* recentelijk het monogene resistentiegen *Rvi6* en andere monogene *R* genen kunnen doorbreken (Soriano *et al.*, 2009), is het waardevoller om meerdere van deze genen te combineren om zo een duurzamere resistentie tegen appelschurft te bekomen. Hierdoor zal de pathogeen het moeilijker hebben om deze meerdere genen en dus polygene resistentie te doorbreken. Voorbeelden van appelcultivars met polygene resistentie zijn de *cV. Discovery* en *Antonovka* (Daniels, 2013). Ook worden fenolen geproduceerd door appelbladeren als reactie op *V. inaequalis* infecties. Zo wordt bijvoorbeeld floridzine afgebroken tot floretine door de pathogeen, wat de groei van de pathogeen limiteert (Hrazdina *et al.*, 1997). Daarnaast kan puroindoline B (*PinB*), een cysteïne rijk proteïne met schimmelwerende werking van graan, de groei van *V. inaequalis* onderdrukken (Chevreau *et al.*, 2001). Andere factoren die de pathogeniciteit en virulentie van *V. inaequalis* bepalen, worden weergegeven in bijlage 1.

4. Suikers en zoete immuniteit

Suikers, sacchariden of koolhydraten verrichten meerdere functies in de plant zoals energie- en koolstoftransport molecule (substraat), hormoonachtige signalering en osmolyten. Hierbij vormt sucrose het primaire product uit de fotosynthese waaruit meerdere types koolhydraten opgebouwd kunnen worden. Het zijn biologische moleculen gevormd uit zuurstof (O), waterstof (H) en koolstof (C) en zijn van fundamenteel belang voor de plant. Afhankelijk van hun ketenlengte worden ze onderverdeeld in vier groepen: monosacchariden, disacchariden, oligosacchariden en polysacchariden. De bekendste monosacchariden zijn glucose (Glu) en fructose (Fru) en zijn beide hexosen. Monosacchariden zijn onmisbaar in het metabolisme van een plant, omdat ze enerzijds de voornaamste energieleverende bron zijn (hoofdzakelijk Glu) en anderzijds belangrijke precursoren vormen in de biosynthese van hogere moleculen. Daarnaast vormen de monosacchariden ribose en desoxyribose de ruggengraat van DNA en RNA. Sommige suikers zoals Glu, Fru en Suc zijn ook van cruciaal belang gebleken als signaal moleculen (zie 4.2 Suiker signalering) en spelen een belangrijke rol in plantreacties onder stress

condities (Rolland *et al.*, 2006; Bolouri-Moghaddam *et al.*, 2010; Bolouri Moghaddam en van den Ende, 2012). Daarnaast hebben suikers ook in zowat alle fysiologische processen bij een normale groei en ontwikkeling van de plant belangrijke functies.

4.1. Suiker signalering

In het algemeen worden source² activiteiten zoals fotosynthese en nutriënten export gestimuleerd onder lage suiker condities, terwijl sink³ activiteiten zoals groei en opslag van reserves gestimuleerd worden onder hoge suiker condities (Koch, 1996). Planten moeten dus de mogelijkheid hebben om suikerverschillen waar te nemen en op deze te kunnen reageren. Fotosynthese en het koolstof metabolisme genereren verschillende suikersignalen die het aan de plant mogelijk maken om zijn koolstof- en energiestatus te controleren. Op deze manier kunnen suikers beschouwd worden als signaalmoleculen tijdens (a)biotische stress (Roitsch, 1999; Gibson, 2005; Rolland *et al.*, 2006; Osuna *et al.*, 2007; Van den Ende, 2013). Volgens Kunz *et al.* (2015) zijn transcript levels van duizenden genen gecorreleerd met veranderingen in suiker levels. Daarnaast kunnen suikermoleculen zich ook gedragen als regulatoren bij stress responsen (Koch, 1996, 2004; Sheen *et al.*, 1999; Rolland *et al.*, 2006; Smeekens *et al.*, 2010). Hierdoor kunnen suikers een belangrijke rol spelen in de plant-pathogeen interacties (Morkunas *et al.*, 2005).

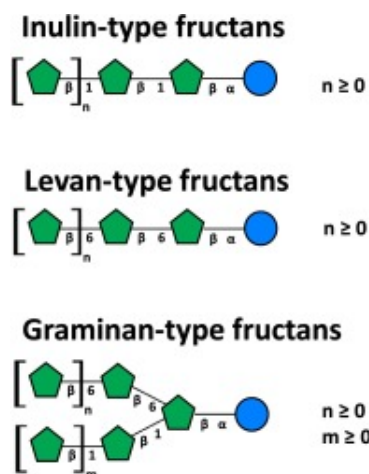
Een belangrijk suikermolecule is sucrose en werd voorgesteld als een endogeen signaal om verdedigingsresponsen te induceren tegen de schimmel *Magnaporthe oryzae* in rijst (Gomez-Ariza *et al.* (2007). Sucrose stimuleert de accumulatie van anthocyaninen (Solfanelli *et al.*, 2006) die een type van flavanoïden zijn. Deze kunnen zich gedragen als een antimicrobieel metaboliet bij het plant verdedigingsmechanisme tegen een pathogeenaanval (Harborne & Williams, 2000; Winkel-Shirley, 2001). Om die reden wordt Suc naar voor gebracht als een DAMP molecule (Duran-Flores en Heil, 2016; Smeekens & Hellmann, 2014). Daarnaast berusten veel groei- en ontwikkelingseffecten ook op de signalerende werking van Glu en Fru (Rolland, 2006). Het best gekende signaal is dat van Glu dat leidt tot differentiële genexpressie (Sheen, 2014). De betrokkenheid van Fru in suiker signalisaties is weinig onderzocht, maar volgens Cho & Yoo (2011) zou Fru-1,6-bifosfatase een mogelijke fructose sensor kunnen zijn. Daarnaast is trehalose-6-fosfaat (T6P) een belangrijk suiker

² Oude bladeren die een netto output aan fotosynthetische producten verbruiken (Roitsch, 1999).

³ Jonge bladeren die een netto input aan fotosynthetische assimilaten ontvangen (Roitsch, 1999).

signaalmolecule voor de groei bij planten (Claeyssen & Rivoal, 2007; Granot *et al.*, 2013; Ruan, 2014). Hexokinase (HXK), *Snf1-related kinase 1* en INV'n zijn momenteel geïdentificeerd als geconserveerde suiker signaal componenten (Valluru & Van den Ende 2011).

Fructanen vormen een ander type koolhydraten die voorkomen in ongeveer 15 % van de bloeiende plant species (Hendry, 1993). Het zijn wateroplosbare sucrose-afgeleide koolhydraten die bestaan uit lineaire of vertakte fructosepolymeren met één glucose eenheid als begin van de keten. Fructaan wordt rechtstreeks van sucrose geproduceerd en wordt gesynthetiseerd en geaccumuleerd in de vacuole van de plant. Hierbij nemen een hele familie van enzymen deel (zogenaamde fructosyltransferasen). Deze enzymen transferen fructose van sucrose naar fructaanketens en zijn gerelateerd aan zure INV'n. Fructaan wordt afgebroken door fructaanexohydrolasen (FEH'n) die sequentieel fructose monomeren vrijgeven vanaf het einde van de fructaanketen (Van den Ende *et al.*, 2004). Er werden ook FEH'n teruggevonden bij bijvoorbeeld *Arabidopsis thaliana* die geen fructanen accumuleren (Van den Ende *et al.*, 2003b; De Coninck *et al.*, 2005). Er bestaan drie klassen van fructanen in planten gebaseerd op hun ketenlengte, vertakkingen en plaats van de fructosylverbindingen, namelijk inuline, levaan en graminaan (zie Fig. 7). Inuline is een lineaire keten van (2-1)-gelinkte β -D-fructosyl eenheden zoals bijvoorbeeld trisaccharide 1-kestriose (ook 1-kestose genoemd). Deze verbindt twee fructose eenheden met één glucose eenheid. Levanen hebben een lineaire keten van (2-6)-



Figuur 7: Schematische voorstelling van inuline, levaan en graminaan (Verspreet *et al.*, 2017).

gelinkte β -D-fructosyl eenheden zoals 6-kestotriose (ook 6-kestose genoemd). Deze verbindt ook twee fructose eenheden met één glucose eenheid. Graminanen bestaan uit (2-1)- en (2-6)-gelinkte β -D-fructosyl eenheden. Fructanen zijn vooral aanwezig in planten die koude en/of droogteperioden moeten overleven. Dit heeft geleid tot de hypothese dat fructanen een rol spelen in de osmotische regeling als reactie op deze stressoren (Wiemken *et al.*, 1995). Het effect van koude op de inductie van fructaan synthese kan toegeschreven worden aan een stijgende concentratie van sucrose in de cel door een lager C gebruik, maar hoge fotosynthese (Martinez-Noël *et al.* 2009).

4.1.1. Invertasen

Invertasen spelen een cruciale rol in de regulatie van sucrose niveaus, sinksterkte en sucrose:hexose ratios gelinkt met de suikersignalering. Vacuolaire-, celwand- en neutrale/alkalische invertasen kunnen onderscheiden worden (Koch, 2004; Xiang *et al.*, 2011). Celwand invertasen (CWI'n) zijn extracellulaire enzymen die sucrose afbreken tot glucose en fructose en kunnen ook beschouwd als PR proteïnen (Roitsch *et al.*, 2003). Ze zijn essentieel voor de regulatie van de apoplastische suikerinhoud en worden geïnduceerd door endogene suikers, PAMP's (Hyun *et al.*, 2009) en JA (Landgraf *et al.*, 2012) in verschillende planten species. Hoge CWI activiteiten zijn nodig om H₂O₂ te genereren, wat een signaalmolecule is in verdedigingsresponsen (Essmann *et al.*, 2008). ABA speelt echter ook een rol in de verdediging van de plant door de expressie van CWI'n en hexose importers te verhogen (Hayes *et al.*, 2010). H₂O₂ stimuleert ook de biosynthese van glutathione S-transferase, wat bijdraagt tot de SA route (Leon *et al.*, 1995; Dong, 2004). Verder zijn MAPKs ook betrokken in deze processen (Hyun *et al.*, 2009).

4.2. Suikers als antioxidanten

Oplosbare suikers bezitten een centrale rol in de cellulaire redox balans door hun nauwe relatie met fotosynthese, mitochondriële respiratie en vetzuur β -oxidatie (Couée *et al.* 2006). Hiervoor kunnen veranderingen in suikerlevels de grootte van de ROS productie in plantcellen gekoppeld aan het oxidatieve metabolisme in de chloroplast, mitochondria en peroxisomen, beïnvloeden. Deze ROS moleculen fungeren als signaalmoleculen en activeren verdedigingsmechanismen in de plant om zo de aangerichte schade tot een minimum te beperken in de plant. Anderzijds moet er ook gewezen worden op het feit dat de geobserveerde correlatie tussen suikers en oxidatieve stress niet in één richting geldt. Hoge suikergehalten kunnen de ROS productie in planten zowel verhogen als verlagen, terwijl hoge en lage suikerlevels ROS accumulatie kunnen uitlokken (Couée *et al.*, 2006). Een teveel aan suikerproductie kan verhoogde H₂O₂ concentraties in het cytosol veroorzaken terwijl het ook een verminderde productie kan veroorzaken toegeschreven aan H₂O₂ stabilisatie via de *oxidative pentose phosphate* (OPP) route (Van den Ende & Valluru 2009; Bolouri-Moghaddam *et al.* 2010). Suikers, vooral bij hogere concentraties, kunnen zich gedragen als ROS stabilisatoren in planten. Disacchariden (trehalose), *raffinose-family oligosaccharides* (RFO's) zoals galactinol, fructanen en suikeralcoholen (soribitol) kunnen fungeren als anti-oxidanten (Nishizawa *et al.*, 2008; Stoyanova *et al.*, 2011; Hernandez-Marin & Martínez, 2012; Peshev *et al.*, 2013). *In vitro* experimenten toonden aan dat zowel fructanen als RFO'n bijdragen tot een verhoogde membraanstabieleit tijdens vriestemperaturen en

cellulaire dehydratatie door invoeging van lipiden in de enkel- en dubbellaag van het membraan (Demel *et al.*, 1998; Vereyken *et al.*, 2001; Hinch *et al.*, 2002, 2003; Valluru & Van den Ende, 2008; Valluru *et al.*, 2008). Op deze manier zijn ze ook belangrijk om OH• radicalen afkomstig van klasse III peroxidase activiteiten in de tonoplast te stabiliseren (Passardi *et al.*, 2004; Van den Ende & Valluru, 2009). Stoyanova *et al.* (2011) en Peshev *et al.* (2013) hebben bevestigd dat fructanen OH radicalen kunnen stabiliseren bij *in vitro* experimenten. Fructanen zijn vergeleken met een reeks van fenolische componenten of antioxidanten om te kijken hoe fructanen en fenolen in een synergistische manier samenwerken om zo bij te dragen aan het vacuolaire antioxidant mechanisme en aan cellulaire homeostase. Peshev *et al.* (2013) leidden verder ook af dat fructanen duidelijke kandidaten waren voor stabilisatie en bescherming van de tonoplast, terwijl RFO'n die gesynthetiseerd werden in het cytosol kandidaten waren om het plasmamembraan te beschermen.

4.3. Zoete immuniteit

Het concept zoete immuniteit bespreekt de rol van suikermoleculen in de verdediging van de plant waarbij ze naast een signalerende functie ook de inductie van defensiemechanismen kunnen leveren. Zowel endogene als exogene suikers kunnen een invloed hebben op het aangeboren immuunsysteem en dus op tolerantie van planten onder abiotische en biotische stress (Versluys, 2016). Suikers kunnen gebruikt worden in de plant voor de biosynthese van zowel structurele als chemische verdediging. Accumulatie van verschillende suikers zoals glucose, fructose, sucrose en fructanen (in fructaan accumulerende planten) is een verwacht proces indien planten abiotische stress zoals droogte, koude of een te hoog zoutgehalte ervaren (Tarkowski & Van den Ende 2015). In celsuspensies van *Arabidopsis* induceren Glu of Suc de expressie van verschillende *PR* genen en zorgen ze voor een accumulatie van PR-2 en PR-5 proteïnen via een SA-afhankelijke reactieweg (Thibaud *et al.*, 2004). Stress induceert grote veranderingen in de source-sink relaties door een significante daling van de fotosynthese efficiëntie in de source weefsels, waardoor er minder oplosbare suiker naar sink weefsels vervoerd kunnen worden. Omgevingsstress kunnen het type van koolhydraten veranderen die gesynthetiseerd en geëxporteerd worden door de source weefsels, waardoor dit zich gedraagt als een suikersignaal systeem voor acclimatie in het sink weefsel (Ceusters *et al.* 2009a, b).

Het concept zoete immuniteit start met de detectie van suikers door receptoren in het plasmamembraan zoals vrijgekomen DAMP's afkomstig van geïnfecteerde cellen of door intracellulaire receptoren. Vervolgens wordt de informatie doorgegeven via signaaltransductie en versterkende MAPK cascades (Bolouri Moghaddam & Van den Ende,

2013; Bolouri Moghaddam *et al.*, 2015). Tenslotte resulteert dit in veranderingen in genexpressie en enzyme-activiteiten die leiden tot verdedigingsresponsen tegen de pathoog. Tijdens een infectie kan Suc werken als een potentiële priming molecule voor plantverdediging door een plotse stijging van de apoplastische concentraties die leiden tot scheuren in de cel. Aangezien Suc kan gehydrolyseerd worden door CWI'n kan dat ook aanleiding geven tot extracellulaire Hex signalen die mogelijks de immuniteit kunnen boosten. In dit opzicht kunnen CWI'n beschouwd worden als PR proteïnen die geïnduceerd kunnen worden door endogene suikers, microbiële elicitors en JA. Zo blijkt dat Suc specifieke signaalwegen bijdragen tot een betere verdediging van de plant (Bolouri Moghaddam & Van den Ende, 2013). Vervolgens zou een exogene fructaanbehandeling ook leiden tot priming van het plant immuunsysteem (Demel *et al.* 1998; Van den Ende, 2013). De werking van fructanen kan verklaard worden door ROS homeostase en signaalmolecule (Van den Ende, 2013). Verhoogde Suc levels leiden typisch tot hogere fructaan, RFO'n en/of anthocyanine concentraties (Teng *et al.*, 2005; Martínez-Noël *et al.*, 2009-2010; Nägele & Heyer, 2013). Dit leidt tot de hypothese dat zowel RFO'n en kleine fructaanmoleculen zich kunnen gedragen als endogene stresssignalen. Meer onderzoek hieromtrent is nodig in de toekomst. Verschillende oligosacchariden kunnen fungeren als een elicitor voor systemische resistentie. Door afbraak van pectines, en meer specifiek homogalacturonaan, tijdens de pathogenese worden er OG'n gevormd die aanleiding geven tot een accumulatie van fytoalexinen en productie van ROS (Davis *et al.*, 1986; Low and Merida, 1996). OG'n zijn homopolymeren van α -1,4-gelinkte D-galacturonide zuur en zijn in het algemeen wateroplosbaar, weinig toxisch en relatief goedkoop te extraheren uit schimmel en plantmateriaal (Cote *et al.*, 1998). Deze extracellulaire OG'n kunnen beschouwd worden als DAMP's (Ferrari *et al.* 2013) en worden vrijgegeven uit de plantencelwand door wond geïnduceerde hydrolytische enzymen tijdens een pathogenaanval (Savatin *et al.*, 2004). In deze thesis zullen OG'n opgenomen worden in de experimenten om de werking als positieve controle te testen bij appelbladeren. Deze worden herkend door transmembraan receptorkinasen, namelijk WAK1 en WAK2 (Brutus *et al.* 2010). *WAK* genen worden opgereguleerd door SA, verwonding en bacteriële infectie (He *et al.*, 1998; Wagner & Kohorn, 2001). Na de herkenning van OG'n door WAK PR receptoren zouden MAPK's zoals het MPK3 en MPK6 betrokken zijn in de signalisatie die na transcriptie en enzymregulatie leidt tot verdedigingsreacties en wijzigingen in het cellulair suikermetabolisme (Kohorn *et al.*, 2011). Volgens Denoux *et al.* (2008) zou de transcriptie van WAK1 enkel stijgen tussen één en drie uur na OG behandeling.

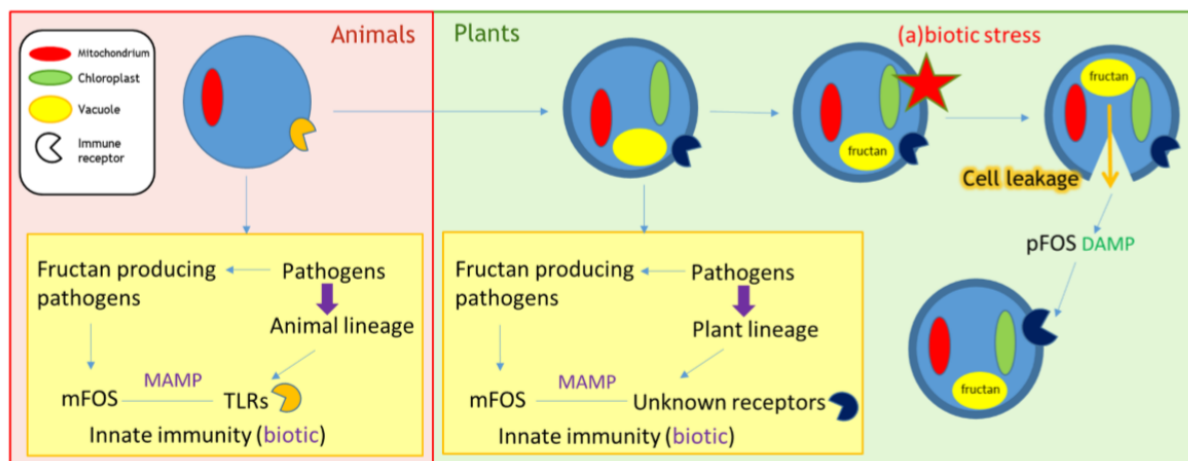
4.3.1. Dubbele rol tijdens infectie

Suikers hebben als het ware een dubbele maar tegengestelde werking tijdens een pathogeeninfectie. Als eerste kunnen suikers een potentiële koolstof- en energiebron vormen voor pathogenen (Morkunas & Ratajczak, 2014). Pathogenen beïnvloeden hiervoor het primaire plant koolhydraten metabolisme in de plant om zo hun eigen suikeraanbod te verhogen. Een klasse van transporters die hier meestal bij betrokken is, worden *Sugars Will be Eventually Effluxed Transporters* (SWEET's) genoemd (Chen *et al.*, 2015; Ruan, 2014). Deze exporteren suikers uit de cellen naar extracellulaire ruimten waar de pathogeen ze gebruikt als voedsel (Asai *et al.*, 2016). Daarnaast kunnen SWEET's ook opgereguleerd worden om suikers te verplaatsen naar infectieplaatsen (Tadege *et al.*, 1998). Verdedigingsreacties zijn het gevolg van een substantiële reprogrammering van de plantencellen (Bolton, 2009; Doehlemann *et al.*, 2008). Zo reageren planten op (a) biotische stress door het suikerniveau te regelen, waardoor energie homeostase kan blijven verzekerd worden. De controle van het suiker en energie metabolisme in cellen wordt gereguleerd door *sucrose non-fermenting-1-related kinase* (SnRK1; Hey *et al.* 2010). Normaal gezien is er een lage suikerconcentratie in de apoplast, waardoor de plant probeert de groei van de pathogeen te beperken. In *Arabidopsis* zijn al 17 *SWEET's* geïdentificeerd en deze vervoeren neutrale suikers zoals Suc, Glu en Fru. Pathogenen bezitten dikwijls sucrolytische enzymen zoals INV'n aangezien Glu het voornaamste koolhydraat is dat wordt opgenomen door de pathogeen (Berger *et al.*, 2007). Door de CWI activiteiten van zowel plant als pathogeen, hexose en Suc transporters (Berger *et al.*, 2007; Tausin & Giardina, 2014) stijgt de Suc degradatie op de plaats van infectie en kan suikerdeficiëntie ontstaan. Hierdoor zal de geïnfecteerde plaats een sinkweefsel vormen, waardoor ook de gewasopbrengst zal dalen (Morkunas & Ratajczak, 2014). CWI'n worden ook opgereguleerd om koolhydraten aan groeiende organen te kunnen blijven leveren tijdens (a)biotische stress condities (Roitsch *et al.*, 2003). Nog steeds is niet duidelijk of pathogenen vertrouwen op de INV enzymen van de plant en de manipulatie van het suikersysteem van de plant of rekenen op hun eigen suiker hydrolases en hexose opname (Naseem *et al.*, 2017). Als tweede rol kunnen planten hun potentiële koolstof- en energiebron gebruiken voor zichzelf om verdedigingsresponsen van de plant te starten door suikerveranderingen waar te nemen (Lastdrager *et al.*, 2014;; Chen *et al.*, 2015). Suikers gedragen zich dus als signaalmoleculen en zullen alternerende suikerniveaus genereren om zo signaalcascades te activeren en expressie van verdedigingsgenen te induceren (Gebauer *et al.*, 2017). Dit werd in paragraaf 4.1. (Suiker signalering) al uitvoerig besproken.

Het zoete immuniteitsmodel voorspelt een inductie van plantenafweer bij milde stress condities, wat leidt tot kleine suikerverschillen in de plant. Deze kleine concentratieverschillen zijn echter niet voldoende om een significante stimulatie van de pathogeengroei te veroorzaken. Zo stelde Ramegowda & Senthil-Kumar (2015) voor dat het enorme nutriëntenverlies uit de cellen in de apoplast infecties stimuleert tijdens een strenge droogte. Een mogelijke verklaring zou kunnen zijn dat de gestimuleerde microbiële groei door een overvloed aan suikers of andere nutriënten de signaal effecten van suikers domineert zodat geen verhoogde plantbescherming kon ontstaan.

4.3.2. Fructanen als DAMP of MAMP

Zowel MAMP's als DAMP's zijn momenteel aanvaard als induceerders van de immuunrespons (Cook *et al.*, 2015). Versluys *et al.* (2017) suggereerde dat suikers en in het bijzonder fructanen dienst zouden kunnen doen als primers van een betere plantverdediging tegen pathogenen. In fructaan producerende planten worden fructanen teruggevonden in de apoplast na (a)biotische stress. Door stress treedt cellyse op, waardoor de fructanen die in de vacuole opgeslagen zijn nu in de apoplast terechtkomen en (gedeeltelijk) gedegradeerd worden tot fructo-oligosacchariden (FOS). Deze fructaanaanwezigheid in de apoplast doet vermoeden dat er een DAMP rol voor de fructanen is weggelegd. Recent bleken FOS uit *Arcitum lappa* planten te primen tegen verschillende pathosystemen (Wang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2013). Toediening van burdock fructo-oligosacchariden (BFO'n) aan tabaksbladeren induceren de expressie van verdedigingsgenen na inoculatie met *B. cinerea* (Van den Ende & El Esawe, 2014). BFO toediening induceert zowel NO als ROS productie, triggert de PR proteïnen accumulatie en zorgt voor verhoogde SA concentraties door een hogere regulatie van PAL en isochorismaat synthase (ICS). De receptor die deze DAMP's detecteert en het signaal voor immuunreacties opstart is echter nog onbekend. Het gebruikte model van Versluys *et al.* (2016) stelt fructanen enerzijds voor als DAMP's (fructaan accumulerende planten) en anderzijds als MAMP's (niet fructaan accumulerende planten; zie Fig. 8). Hierbij werd met een mogelijke evolutionaire gebeurtenis rekening gehouden die een perceptieverandering veroorzaakt van MAMP naar DAMP in fructaan opbouwende planten.



Figuur 8: Het model van Versluys *et al.* (2017) waarin fructanen via hun rol als DAMP's of MAMP's plant immuniteitsreacties kunnen induceren. Verschillende fructaan accumulerende pathogenen produceren mFOS als virulentie factoren. Door biotische interacties en selectie kunnen planten deze mFOS herkennen als MAMP's door specifieke receptoren om zo immuun responsen te induceren. Bij dieren worden deze mFOS herkend door TLR receptoren die immuniteitsreacties induceren. De mogelijkheid bestaat dat dergelijke receptoren in de plant, die voorlopig nog onbekend zijn, ook deze mFOS binden. Naast MAMP's kunnen fructanen (pFOS) in fructan producerende planten tijdens (a)biotische stress uit de vacuole, waar ze opgeslagen worden, lekken en in de apoplastische omgeving terecht komen. Daar kunnen ze afgebroken worden tot pFOS die eveneens via nog onbekende receptoren als DAMP's gebonden worden en zo het immuunsysteem van de plant activeren.

Onder de micro-organismen worden veel meer levan- dan inuline-typen gevonden (Toksoy *et al.*, 2016). De graad van polymerisatie van fructanen in micro-organismen is hoger dan deze in planten zodat de microbiële fructanen waarschijnlijk immobiel zijn en eerst afgebroken moeten worden vooraleer ze immunoreacties kunnen opstarten in de plant. FEH'n zijn mogelijke kandidaten die via hun enzymatische activiteit celwand mobiele FOS creëren (Van den Ende *et al.*, 2004). Bij dieren is de herkenning van microbiële fructanen door *Toll-like receptors* (TLR's) in het plasmamembraan (PM) goed beschreven. Deze receptoren activeren de aangeboren immuniteit. Ook bij planten zou dit proces zich voordoen. Kortere microbiële fructo-oligosacchariden (mFOS) diffunderen door de celwand en gedragen zich als MAMP's om zo het immuunsysteem te activeren. Na het vrijkomen van plant fructo-oligosacchariden (pFOS'n) uit de vacuole, die meer mobiel zijn en door de celwand diffunderen naar naburige cellen, kunnen mogelijks als MAMP's beschouwd worden door nog nader te bepalen receptoren in het PM. Al deze observaties doen vermoeden dat fructanen betrokken zijn in het induceren van een zoete immuniteit en dus ingezet kunnen worden als exogene priming moleculen tegen zowel biotische als abiotische stress (Van den Ende en El-Esawe, 2014).

5. Doelstelling

In deze masterthesis willen we de invloed en effectiviteit van exogene fructanen behandelingen en endogene suikergehalten op de gevoeligheid van appel voor appelschurft, veroorzaakt door de hemibiotrofe schimmel *Venturia inaequalis*, onderzoeken. Hiervoor trachten we appelzaailingen in een geprimeerde staat te brengen door ze te besproeien met drie verschillende fructanen: graminanen, levanen en inulinen. Drie dagen later werden de geprimeerde bladeren geïnoculeerd met conidiosporen van *V. inaequalis*. Door op verschillende tijdstippen bladstalen te nemen en deze te analyseren, kunnen we vaststellen of er een relatie bestaat tussen de endogene suikergehalten in de appelzaailingen en het verdedigingsmechanisme van de planten tegen appelschurft. Daarnaast werden ook op verschillende posities van de plant bladstalen genomen om zo het effect van de primingcomponenten en dus ook van de verdediging afhankelijk van de leeftijd van het blad te onderzoeken. We focussen ons op fructanen en proberen hun functie als PAMP molecule vast te stellen. Deze suikercomponenten kunnen als potentiële induceerders van het zoete immuniteitsconcept dienen. Ook werd de werking van OG'n getest als DAMP molecule, waardoor deze OG'n dienst zouden kunnen doen als een positieve controle. Met behulp van twee inoculatie-experimenten werd getracht zoveel mogelijk informatie te bekomen over de potentiële *sweet immunity primers* bij appel. De kwantificatie van de schimmel in de appelbladeren werd op twee verschillende manieren uitgevoerd. Als eerste werden de macroscopische sporulatiesymptomen opgevolgd met behulp van visuele evaluaties en als tweede werd het DNA van deze schimmel uit geïnoculeerde bladeren geëxtraheerd en daarna gemeten via kwantitatieve PCR (qPCR). Hierdoor kon de sporulatie en groei van de fungus opgevolgd worden tijdens de experimenten. De suikergehalten van glucose, fructose en sucrose werden bepaald via chromatografie (HPAEC-IPAD) om zo hun signalerende werking te kunnen linken met de sporulatie en kwantificatie van de schimmel *V. inaequalis* op de geprimeerde bladeren. Suikercomponenten met een primende werking kunnen beschouwd worden als *sweet immunity primers* en hierdoor leiden tot een betere ziekteresistentie tegenover appelschurft. Tot slot werd ook het direct effect van de verschillende primingcomponenten onderzocht op de groei van een *V. inaequalis* kolonie door middel van een derde *in vitro* experiment. Hierbij werden verschillende voedingsmedia aangemaakt waar vervolgens een specifiek primingcomponent met specifieke concentratie werd aan toegevoegd. Daarna werd een kleine cirkelvorige *V. inaequalis* kolonie getransfereerd op deze verschillende primingsmedia waarna de groei van de lesiediameter van elke schimmelkolonie werd opgevolgd in de tijd.

Materiaal en methoden

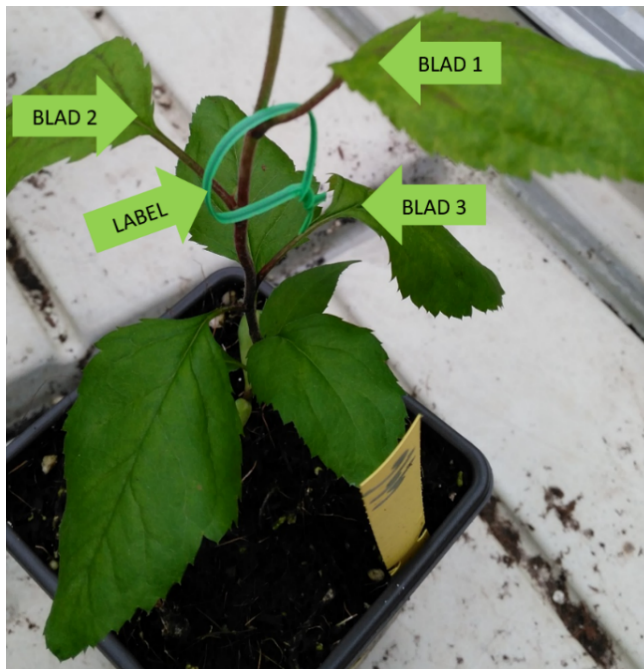
1. Biologisch materiaal

1.1. Appelplanten

Voor het eerste en tweede experiment werd gewerkt met jonge appelplanten die opgekweekt werden vanaf zaad afkomstig van het veredelingsbedrijf Better3fruit. De zaden waren afkomstig van een kruising tussen de cultivar *Red Delicious* en een schurftgevoelige Better3fruit selectie (R5/3/78). Eerst en vooral werden de zaden gestratificeerd in nat zand bij 4°C. Na kieming van de meerderheid van de zaden in een klimaatkast bij 4°C, werden deze vervolgens getransfereerd naar plastieken bomentrays 2520 van Modiform. De voordelen van deze methode zijn dat de ontkiemde zaden de overige zaden lijken te stimuleren om zo ook tot kieming over te gaan en dat de reeds vroeg ontkiemde zaden geen al te grote voorsprong gaan ontwikkelen ten opzichte van de later gekiemde zaden. De bomentrays werden gevuld met Jiffypots strips uit veen. Hierin werd een mengsel van potgrond (DCM potgrond voor professionals) en osmocote toegevoegd. In totaal werd er per zak van 70 liter potgrond 150 g Osmocote (Exact 3-4 maand met samenstelling 16-9-12 + 2 MgO +TE) toegevoegd. Bijkomend werd er 75 g Trianium-G toegevoegd per zak potgrond om abnormale groei van de planten door *Pythium* te beperken. De uitgeplante zaden werden vervolgens nat gehouden in de serre van Better3fruit in Rillaar en daarna naar de serres van de KU Leuven in Heverlee getransporteerd. Hier werden ze verder opgekweekt onder gecontroleerde omstandigheden i.e. dag-nacht temperatuur van respectievelijk 20-15°C en een constante relatieve luchtvochtigheid van 70 %. Extra geassimileerde belichting werd voorzien door TL-lampen met een belichtingssterkte van 25 W/m² bovenaan de serre indien de lichtstraling minder dan 100 W/m² bedroeg in de serre.

Bij het eerste experiment werden 392 planten uit de trays twee weken voor de priming behandelingen verplant naar losstaande zwarte plastieken plantenpotjes. Dit was noodzakelijk om de plantjes individueel te kunnen behandelen en randomisatie te kunnen inbouwen in het experiment. Bij het tweede experiment werden 840 gekiemde zaden direct uitgeplant in de losstaande plantenpotjes in de KU Leuven serre in Heverlee zodat deze planten later niet meer verplant moesten worden. Deze werden opgekweekt onder gecontroleerde omstandigheden i.e. dag-nacht temperatuur van respectievelijk 21-19.5°C en een dag-nacht relatieve luchtvochtigheid van respectievelijk 60-70 %. Extra geassimileerde belichting werd voorzien door TL-lampen met een belichtingssterkte van 50 W/m² bovenaan de serre indien de

lichtstraling minder dan 100 W/m² bedroeg in de serre. Vanaf het moment dat de planten zes bladeren ontwikkeld hadden, werden ze verplaatst naar een ander serre-compartment waar ze verder opgekweekt werden onder gecontroleerde omstandigheden i.e. dag-nacht temperatuur van respectievelijk 20-15°C en een constante relatieve luchtvochtigheid van 70 %. Extra geassimileerde belichting werd voorzien door TL-lampen met een belichtingssterkte van 25 W/m² bovenaan de serre indien de lichtstraling minder dan 100 W/m² bedroeg in de serre. De planten werden geprimed indien er acht bladeren ontwikkeld waren (bladstadium acht) met de te testen componenten en werden drie dagen later geïnoculeerd met conidiosporen van *V. inaequalis*. Voor alle evaluaties (i.e. visuele evaluatie, qPCR en suikeranalyse) werden telkens de drie jongste bladeren geanalyseerd. Deze werden vóór de inoculatie (0 dpi) gelabeld door een groen ijzerdraadje rond het jongste blad (1) te hangen zodat ten allen tijde duidelijk was welke bladeren zeker geïnfecteerd werden om zo het effect van de priming componenten te kunnen vaststellen. De twee bladeren die zich onder het jongste blad bevinden zijn oudere bladeren. Het eerste blad onder het jongste blad (blad 2) is iets jonger dan het tweede blad onder het jongste blad (blad 3; zie Fig. 9).

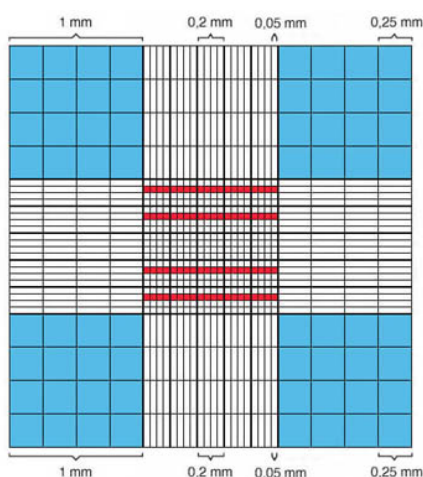


Figuur 9: Voorstelling van de appelbladeren per positie. De appelplanten werden gelabeld rond het jongste blad (blad 1) met behulp van een groen ijzerdraadje (label). Het eerstvolgende blad onder blad 1 is blad 2 met daaronder het oudste blad (blad 3).

1.2. *Venturia inaequalis*

1.2.1. Preparatie van de sporenoplossing

De schimmelsporen die gebruikt werden voor de inoculatie van de geprimede appelplanten waren afkomstig van bladeren verzameld in 2017. Ze werden bewaard in een vriezer bij -20°C en behoorden tot ras 1. Goed geïnfecteerde bladeren door *V. inaequalis* werden versnipperd in een maatbeker waar gedestilleerd water werd aan toegevoegd. Dit geheel werd gedurende vijf min op ijs losgeweekt waarbij regelmatig geroerd werd in de oplossing. Hierna werd de oplossing via metalen zeef overgebracht in een andere maatbeker die op ijs werd gehouden zodat er nog geen kieming van de sporen kon ontstaan. Van deze sporenoplossing werd één druppel via een plasticen pipet aangebracht op een Neubauer telplaat om de sporenconcentratie te bepalen. Dit gebeurde door met een lichtmicroscop alle sporen op één volledig blauw gekleurd vak te tellen, wat bestond uit 16 vierkanten (zie Fig. 10). Daarna werd de sporenoplossing verdund met gedestilleerd water om op die manier de gewenste sporenconcentratie (200 000 sporen per ml) te bekomen. Ook werden enkele druppels van 0.0001 % Tween 20 surfactant toegevoegd, waardoor de oppervlaktenspanning van de oplossing verlaagd kon worden en dus een betere verspreiding over het bladoppervlak verkregen werd. Vervolgens werd de telplaat in een petriplaat op een vochtig doekje bewaard om zo uitdroging



Figuur 10: Structuur van Neubauer telplaat.

te voorkomen van de sporen. Na 24 u werden het aantal gekiemde sporen geteld om op die manier het kiemingspercentage te bepalen. Het kiemingspercentage bekomt men door het aantal sporen met kiembuizen te tellen en dit aantal te delen door het totaal aantal sporen in één gekleurd vak. Er werd gewerkt met ongeveer 200 000 sporen per mL waarbij het kiemingspercentage gemiddeld 62 % bedroeg in het eerste experiment. Bij het tweede experiment bedroeg de inoculatieoplossing ongeveer 240 000 sporen per mL met een gemiddeld kiemingspercentage van 47 %.

1.2.2. Inoculatie

Voor de schurftinoculatie werd de sporenoplossing overgebracht in een Birchmeier Foxy Plus handsproeier van 500 ml. De appelplanten werden op voorhand onder de incubatieconstructie afgedekt met een zwarte plasticen folie (zie Fig. 11), geplaatst die met behulp van twee luchtbevochtigers (Boneco) op een constante relatieve luchtvochtigheid van 100 % werd gehouden. Vervolgens werden de planten aan de top meermaals verneveld met de sporenoplossing totdat de bovenste bladeren, en zeker de 3 meest gevoelige, goed vochtig waren. De planten werden 48 uur lang in de inoculatieconstructie bij een temperatuur van 20°C gehouden om zo een succesvolle infectie te bekomen. Uit de grafiek van Mills en LaPlante kunnen we aflezen dat *V. inaequalis* bij 20°C en een continue bladnatperiode al in staat is om



Figuur 11: Constructie van de inoculatietent die gebruikt werd voor de infectie van appelzaailingen met *V. inaequalis* sporen.

6-7 u na de inoculatie te infecteren in een gecontroleerde omgeving. Na deze periode van infectie werden de planten terug in het licht gebracht en onder sproeiers geplaatst om de gunstige groeiomstandigheden voor *V. inaequalis* te behouden. Deze sproeiers vernevelden om de 6 min 20 sec de planten, waardoor een blijvende bladnatperiode gecreëerd werd. Rond 10 dpi werden de symptomen van infectie goed zichtbaar, waardoor de sproeiers werden uitgeschakeld.

2. Priming componenten

Drie dagen voor de inoculatie werden de verschillende primingbehandelingen uitgevoerd. In het eerste experiment werden drie fructanen gebruikt als priming moleculen, namelijk levanen, inulinen en graminanen. Bij het tweede experiment werd enkel inulinen en levanen meegenomen. Verder werden oligogalacturoniden (OG'n) getest als positieve controle. Aangezien de DAMP werking van OG'n nog niet gekend is bij appelzaailingen, werd ook een tweede positieve controle ingezet, namelijk fosetyl-Aluminium (Al). Deze is een systemisch fungicide en wordt bij voorkeur preventief (mogelijk via priming) toegepast. Planten die met water behandeld werden, dienden als een negatieve controle. Tot slot werden zowel in het eerste als in het tweede experiment ook onbehandelde planten meegenomen.

2.1. Levanen

Deze oplossing met een concentratie van 1 g/l werd bereid door 1 gram gezuiverde Dactylis levanen op te lossen in 1 liter milliQ water, wat 0.0001% Tween 20 surfactant bevat.

2.2 Inulinen

Deze oplossing met een concentratie van 1 g/l werd bereid door 1 gram gezuiverde inulinen op te lossen in 1 liter milliQ water, wat 0.0001% Tween 20 surfactant bevat.

2.3. Graminanen

Deze oplossing met een concentratie van 1 g/l werd bereid door 1 gram gezuiverde graminanen op te lossen in 1 liter milliQ water, wat 0.0001% Tween 20 surfactant bevat.

2.4. Oligogalacturoniden

Deze oplossing met een concentratie van 0.5 g/l werd bereid door 0,5 gram gezuiverde OG'n op te lossen in 1 liter milliQ water, wat 0.0001% Tween 20 surfactant bevat.

2.5. Fosetyl-Aluminium

Fosetyl-Aluminium (Aliette® 80 WG, Bayer Cropscience) werd in het eerste experiment ingezet als een tweede positieve controle voor de visuele evaluaties. Bij het tweede experiment werd fosetyl-Al meegenomen in alle analyses. Er werd gewerkt met een concentratie van 12.5 g/l.

3. Experimentele opstelling en staalnames

3.1. Inoculatie-experiment 1

De appelzaden van het eerste experiment werden uitgezaaid op 21 september 2017. De zeven priming behandelingen werden uitgevoerd op 3 november en de schurftinoculatie met schimmelsporen van *V. inaequalis* volgde drie dagen later. Hierdoor hadden de planten een priming periode van drie dagen. De appelzaailingen werden willekeurig aan een specifieke behandeling toegewezen zodat er geen grote verschillen zouden bestaan binnen eenzelfde behandelingsgroep. De priming behandelingen werden uitgevoerd met behulp van glazen proeiflesjes van 100 ml. De drie jongste bladeren van de appelplanten werden bespoten met ongeveer 2 mL per plant van de primingoplossing. De volgende behandelingen werden in het eerste experiment toegepast:

- * Negatieve controle met MiliQ water + surfactant (0.0001 % Tween 20)
- * Eerste positieve controle met OG'n 0.5 g/l + surfactant (0.0001 % Tween 20)
- * Tweede positieve controle met fosetyl-Al 12.5 g/l + surfactant (0.0001 % Tween 20)
- * Onbehandelde planten (tweede negatieve controle)
- * Graminanen 1 g/l + surfactant (0.0001 % Tween 20)
- * Levanen 1 g/l + surfactant (0.0001 % Tween 20)
- * Inulinen 1 g/l + surfactant (0.0001 % Tween 20)
- * Niet geprimede en niet geïnoculeerde om het effect van 100 % *relative humidity* (RH) in de tunnel te bekijken op de planten.

Enkel de drie jongste gemerkte bladeren werden gebruikt voor de analyses, omdat deze het meest gevoelig zijn en het beste mogelijke effecten van de priming componenten kunnen tot expressie brengen. Vóór, 24u na en 72u na de priming (juist vóór in de inoculatie op 0 dpi) werden gepoolde bladstalen genomen om zo priming effecten op suikerniveau te kunnen detecteren. Bij het nemen van de bladstalen in het eerste experiment werden telkens de drie jongste bladeren van één plant samen in een 10 mL falcon tube opgeslagen. Per bladstaal waren vijf replicaten. Vervolgens werden deze tubes ondergedompeld in vloeibare stikstof om uiteindelijk bewaard te worden in vriezers bij -80°C. Op een relatief vroeg tijdstip (4 dpi), middentijds tijdstip (8dpi) en één relatief laat tijdstip (14 dpi) werden opnieuw bladstalen genomen voor de kwantificatie van *V. inaequalis* DNA met qPCR als voor suikeranalyse met behulp van HPAEC-IPAD. Vanaf 4 dpi werden de eerste symptomen op de bladeren zichtbaar en werd de visuele evaluatie van appelschurft op de bladeren gestart. Voor de visuele evaluatie werden 12 appelplanten per behandeling voorzien. De daaropvolgende evaluatiemomenten vonden plaats op 6, 8, 10, 11, 13, 15, 17, 18, 20 en 22 dpi. De bladstalen in de tubes moesten eerst drie dagen gedroogd worden in de lyofilisator (Labconco, Freezone 4.5) vooraleer met de analyse gestart kon worden.

3.2. Inoculatie-experiment 2

De appelzaden van het tweede experiment werden uitgezaaid op 9, 10 en 11 januari 2018. De zes priming behandelingen werden uitgevoerd op 16 februari 2018 en de schurftinoculatie volgde net zoals in het eerste experiment drie dagen later. De priming en inoculatie gebeurde op dezelfde manier als in het eerste experiment om zo weinig mogelijk verschillen te hebben tussen beide experimenten, waardoor de resultaten met elkaar vergeleken kunnen worden. Ook in dit experiment werden de appelzaailingen willekeurig aan een specifieke behandeling toegewezen. De volgende behandelingen werden in het tweede experiment toegepast:

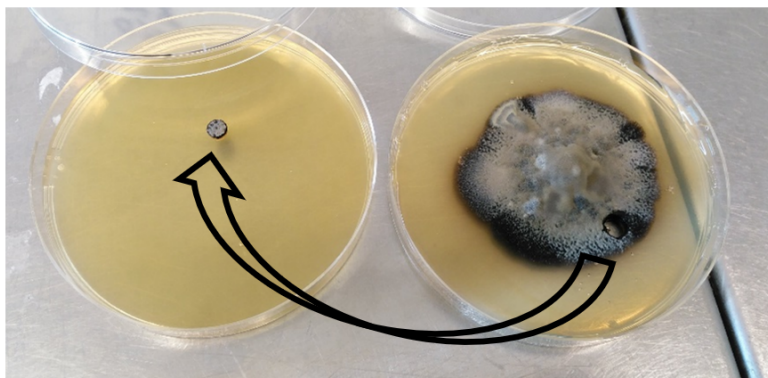
- * Negatieve controle met MiliQ water + surfactant (0.0001% Tween 20)
- * Eerste positieve controle met OG'n 0.5 g/l + surfactant (0.0001% Tween 20)
- * Tweede positieve controle met fosetyl-Al 12.5 g/l + surfactant (0.0001% Tween 20)
- * Onbehandelde planten (tweede negatieve controle)
- * Levanen 1 g/l + surfactant (0.0001% Tween 20)
- * Inulinen 1 g/l + surfactant (0.0001% Tween 20)
- * Niet geïnoculeerde en niet geprimede planten als negatieve controle

Net zoals in het eerste experiment werden enkel de drie jongste bladeren gebruikt voor de analyses. Bladstalen werden genomen vóór en 72u na de priming behandelingen om zo priming effecten op suikerniveau te kunnen detecteren. Het labelen van de bladeren verliep op dezelfde manier als in het eerste experiment. Bij het nemen van de bladstalen in het tweede experiment werden stalen genomen per blad. Om genoeg plantmateriaal te hebben per staal voor de analyses, werd telkens bij vijf planten blad 1/2/3 genomen. Deze vijf bladeren op positie 1/2/3 werden dan samen in een 10 mL falcon tube opgeslagen. Per staal waren vier replicaten. Vervolgens werden deze tubes ondergedompeld in vloeibare stikstof om uiteindelijk bewaard te worden in vriezers bij -80°C. Ook de tijdstippen waarop bladstalen genomen werden na de inoculatie veranderde niet. Tot slot verliepen de visuele evaluaties ook op dezelfde manier als in het eerste experiment. Voor de visuele evaluatie werden 10 appelplanten per behandeling voorzien. Deze evaluatiemomenten vonden plaats op 4, 5, 7, 9, 11, 12, 14, 16, 18, 19 en 21 dpi. Daarna konden de stalen geanalyseerd worden, maar deze moesten eerst drie dagen gedroogd worden in de lyofilisator.

3.3. Experiment 3: *in vitro* testen

Aangezien er geen eenduidige effecten uit de resultaten van experiment 1 en 2 af te leiden waren, werd besloten om ook het direct effect van de gebruikte componenten op de groei van de schimmelkolonie *V. inaequalis* te onderzoeken met behulp van een *in vitro* experiment. Hierbij werden eerst en vooral water en malt extract media aangemaakt om vervolgens schimmelsporen te isoleren en te transfereren. In de literatuur is nog niet veel bekend over isolatietechnieken en opgroei van *V. inaequalis* bij *in vitro* experimenten. Via dit derde experiment zal dus informatie verkregen worden over het effect van verschillende componenten, maar ook over de schimmelgroei en over isolatie en groeipatronen van *V. inaequalis*. Er werd in dit experiment steriel gewerkt om geen contaminatie te krijgen.

Als eerste werd een water agar medium aangemaakt als kiemingsmedium en in meerdere petriplaten uitgegoten. Er werden twee verschillende manieren getest om schimmelsporen op het waterige agarmedium aan te brengen. Bij de eerste methode werd een steriel wattenstaafje ondergedompeld in een steriel epje gevuld met 200 mL geautoclaveerd water om daarna met staafje op een geïnfecteerd appelblad door *V. inaequalis* te drukken gedurende een halve seconde. Dit geïnfecteerde wattenstaafje werd daarna drie keer in een nieuw steriel epje gevuld met 100 mL geautoclaveerd water ondergedompeld. Deze oplossing met schimmelsporen werd daarna gepipetteerd op het kiemingsmedium in een petriplaat en tot slot uitgesmeerd met een steriele inoculatielus. Bij de tweede methode werd eerst 100 mL geautoclaveerd water op een geïnfecteerd blad gepipetteerd om zo rechtstreeks een oplossing met schimmelsporen te bekomen. Vervolgens werd een steriele tandenstoker ondergedompeld in 5 g methyl-cellulose opgelost in 300 mL milliQ water en in deze schimmeloplossing op het blad geduwd gedurende een halve seconde. De oplossing van methyl-cellulose zorgt ervoor dat de schimmelsporen beter aan de tandenstoker zouden kleven. Daarna werd de tandenstoker met sporen voorzichtig op het water medium gedrukt gedurende een halve seconde om zo schimmelsporen over te brengen op het kiemingsmedium. Vervolgens werden deze water media 24u geïncubeerd in een donkere ruimte bij kamertemperatuur zodat de sporen kunnen kiemen met zichtbare kiembuizen. Daarna werd één goed gekiemde schimmelspore geïsoleerd uit het kiemingsmedium met behulp van een mesje en microscoop en werd deze overgeplaatst op een petriplaat met daarin een malt medium als groeimedum. Deze petriplaten werden daarna geïncubeerd in een donkere ruimte bij kamertemperatuur voor gedurende meerdere weken zodat een zuivere *V. inaequalis* kolonie bekomen kon worden. Het kiemingsmedium werd aangemaakt door in een glazen fles 30 g water agar op te lossen in 1 liter milliQ water. Bij het groeimedum werd in een glazen fles 35 g malt extract opgelost in 1 liter milliQ water. Vervolgens werden deze glazen flessen



Figuur 12: Transfer van cirkel uit *V. inaequalis* kolonie naar een malt medium met een toegevoegd getest priming component.

geautoclaveerd. Daarna werd zowel aan het kiemings- als groeimedum 25 mg/l van het antibioticum Enrofloxazin toegevoegd om de bacteriële groei te onderdrukken in de media.

Indien de diameter van de *V. inaequalis* kolonie groot genoeg was, werd met behulp van een steriel metalen staafje een cirkelvormig stukje (diameter 5 mm) uit de schimmelkolonie gehaald en op een malt medium die een specifiek priming component bevat, getransfereerd (zie Fig. 12) zodat het direct effect van het component aanwezig in het medium onderzocht kan worden op de groei van de *V. inaequalis* kolonie.

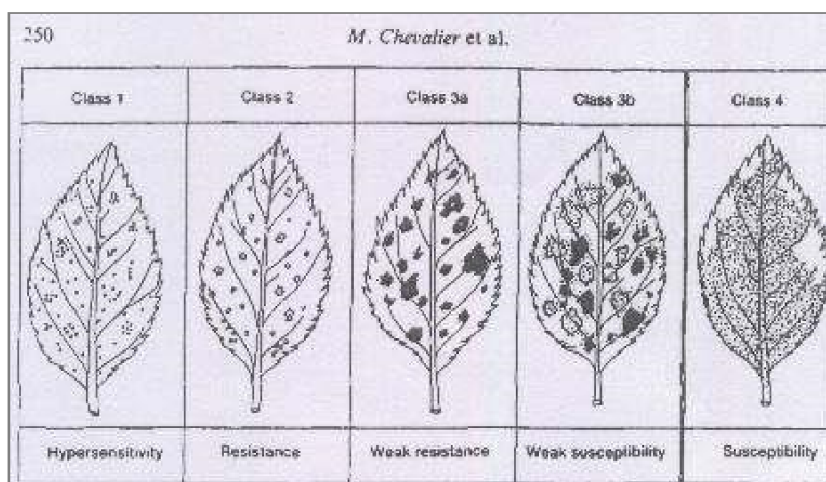
De volgende media werden in het derde experiment getest:

- * Media met levanen
- * Media met inulinen
- * Media met fosetyl-Al
- * Media met OG'n
- * Onbehandelde media als controle

Deze malt media werden op dezelfde manier als hierboven beschreven staat, gemaakt. Dit geheel werd geautoclaveerd. Daarna werden de media onderverdeeld in verschillende submedia waaraan dan één specifiek primingcomponent werd toegevoegd. Echter werd ook rekening gehouden met concentraties van de componenten, waardoor drie verschillende concentraties getest werden in dit experiment. Dezelfde concentraties als bij het eerste en tweede experiment werd hier gebruikt als startconcentraties voor de submedia. Vervolgens werd tweemaal een tienvoudige verdunning gemaakt van deze startconcentraties om ook het effect van verschillende concentraties op de groei van de schimmel te zien. Tot slot werd aan de submedia ook 25 mg/l van het antibioticum Enrofloxazin toegevoegd om de bacteriële groei te onderdrukken. Daarna konden de submedia uitgegoten worden in petriplaten onder steriele condities. Er werden drie replicaten gemaakt per component met één specifieke concentratie.

4. Visuele evaluatie appelschurft op bladeren

Niet alle planten zijn even gevoelig aan appelschurft en dit verschil vertaalt zich in verschillende, maar specifieke symptomen. Chevalier *et al.* (1991) ontwikkelden een klassiek fenotypische ziektebeoordeling gebaseerd op chlorose-, necrose- en sporulatiescores van bladeren om zo de graad van infectie te kunnen bepalen per blad. Ze evalueerden deze specifieke symptomen op nakomelingen van een kruising tussen een commerciële en een resistente variëteit. Er werden zes verschillende Chevalier klassen gedefinieerd, namelijk klassen 0, 1, 2, 3a, 3b en 4 (zie Fig. 13). Planten met symptomen uit klassen 0, 1, 2 en 3a worden als resistent beschouwd, terwijl planten ingedeeld in klassen 3b en 4 gevoelig zijn aan appelschurft (Chevalier *et al.*, 1991).



Figuur 13: Voorstelling van de 5 verschillende klassen volgens Chevalier *et al.* (1991). Klasse 0 is niet weergegeven.

In klasse 0 werden de planten ingedeeld waarvan de plant-pathogeen interactie zich niet uitte in zichtbare symptomen. Bij klasse 1 zijn pin points op het bladoppervlak zichtbaar. Dit zijn donker bruine instulpingen met een diameter kleiner dan 1 mm als gevolg van een HR van de plant op de pathogeen (Chevalier *et al.*, 1991). Planten met enkel chlorose verschijnselen behoren tot klasse 2. Klasse 3a en 3b bevatten planten met chlorose en necrose, al dan niet samen voorkomend. Klasse 3a bevat echter geen of weinig sporulatie (<1 % van het bladoppervlak). Tot klasse 3b behoren echter de bladeren met een significante hoeveelheid (1-50 % van het bladoppervlak) sporulatie. Planten van klasse 4 vertonen interacties tussen *V. inaequalis* en appel die resulteren in sporulatiehoeveelheden groter dan 50 % van het bladoppervlak zonder dat er significante chlorose of necrose zichtbaar is (Chevalier *et al.*, 1991).

In deze thesis werden telkens de drie jongste bladeren per plant geëvalueerd, wat betreft hun percentage sporulatie ten opzichte van het totale bladoppervlak (klassen 0-7: respectievelijk 0, 0-1, 2-5, 6-10, 11-25, 26-50, 51-75, >75 %). Ook de parameters chlorose (klassen 0-4: respectievelijk 0, 1-25, 26-50, 51-75, >75 %) en necrose (klassen 0-3: respectievelijk 0, pin

$$DS (\%) = \frac{\sum (nv)}{NV} \times 100,$$

where n – degree of infection according to the scale,
v – number of leaves per category,
V – total number of leaves screened,
N – highest degree of infection.

Figuur 14: Formule van Towsend en Heuberger (1943).

points, <50 %, >50 %) werden gescoord. De verkregen waarden werden met behulp van de formule van Townsend-Heuberger (zie Fig. 14; Towsend en Heuberger, 1943) omgezet in TH-waarden die vervolgens het percentage aan infectie, sporulatie, chlorose en necrose per plant

weergeven. Met behulp van deze drie graden kan een plant in een Chevalier klasse ingedeeld worden. Tot slot geeft deze methode echter niet altijd een accuraat beeld van de infectiegraad aangezien vroege schimmelontwikkeling in symptoomloze bladeren niet gedetecteerd kan worden.

5. Kwantificatie groei van *V. inaequalis* in het blad

In beide experimenten werden telkens drie individuele bladeren (blad 1, 2 en 3) per plant verzameld op vooraf bepaalde tijdstippen om naast de visuele evaluatie ook een kwantitatieve meting te kunnen uitvoeren van de groei van de schimmel op basis van de totale hoeveelheid genomisch *V. inaequalis* DNA aanwezig in het bladweefsel.

5.1. DNA extractie

DNA extracties werden uitgevoerd met de DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) zoals beschreven in Daniels (2013). Hiervoor werd eerst het gevriesdroogde bladweefsel (<20 mg) met een spatel verbrijzeld in de falcon tube. Daarna werd met behulp van 4 keramische bolletjes en de schuddende beweging van het Fastprep toestel het bladweefsel omgezet tot fijngemalen poeder (2x 30 sec aan 5500 ronden per minuut (rpm)). Vervolgens werd met behulp van de instructies van het protocol, dat opgesteld was door de fabrikant zelf, DNA geïsoleerd. De hoeveelheid geëxtraheerd DNA werd met de Nanodrop 2000 toestel spectrofotometrisch bepaald. Alle extracten werden achteraf verdund met miliQ water tot een DNA concentratie van 5 ng/μl per staal.

5.2. Kwantitatieve PCR (qPCR)

De kwantitatieve *polychain reaction of real time-PCR* werd uitgevoerd volgens een in-huis protocol in reacties (totaalvolume 25 μl) met behulp van een Rotor-Gene Qiagen toestel. Elke reactie bevatte 5 μl DNA met een concentratie van 5 ng/μl. Aan elk staal werd 20 μl mastermix toegevoegd, wat bestond uit 4 μl miliQ water, 1.25 μl *V. inaequalis* ITS1-specifieke *forward* en 1.25 μl *reverse* primers (10 μM), 1 μl *V. inaequalis* specifieke probe (5 μM) en 12.5 μl taq-man probe mastermix. De kwantificatie van het *V. inaequalis* DNA werd bepaald met behulp van een standaardcurve. Deze werd opgesteld met de gekende concentraties van 50 pg/μl van een *Venturia* ras 1 isolaat en werd vervolgens verdund tot 5 pg/μl, 1 pg/μl, 0.2 pg/μl en 0.04 pg/μl. Tot slot werd bij elke reactie een controle toegevoegd dat geen *V. inaequalis* DNA bevatte maar enkel miliQ water. Per staal werden telkens twee herhalingen uitgevoerd. In het

Rotor-gene Q apparaat ondergingen de stalen een temperatuursverhoging tot 95°C gedurende 10 minuten ter activatie van de taq-man probe. Vervolgens werden de stalen 15 sec aan 95°C verhit en herhaald in 40 cyclussen op 60 sec aan 60°C per cyclus waarna het fluorescent signaal werd gedetecteerd. De CT-drempelwaarde werd vastgelegd op 0.02 en een efficiëntie tussen 0.9 en 1.1 zou bereikt moeten worden. Aan de hand van de verkregen standaardcurve en CT-waarden via het Rotor-Gene Q Series Software, werden de concentraties *V. inaequalis* DNA in pg/μl berekend met behulp van volgende formule: $[DNA\ V. inaequalis] = 10^{(-0.207 \times CT + 6.270)}$.

6. Suikeranalyse via HPAEC-IPAD

In het eerste experiment werden drie gevriesdroogde bladeren per plant samen in één falcon tube gebracht om zo als 1 staal geanalyseerd te worden. Het openbreken van de cellen gebeurde mechanisch met behulp van een spatel. Daarna werd 1400 μl miliQ water toegevoegd aan 100 mg afgewogen bladweefsel. Dit werd vervolgens gedurende 10 minuten gekookt op 100°C. Na centrifugatie (5 minuten aan 14000 rpm) werd 200 μl van het supernatans overgebracht op een *mixed bed ion exchange* glaskolom met twee ionenuitwisselaars (200 μl Dowex® - 50 H⁺ en 200 μl Dowex® -1-acetate) en werd de uitlopende oplossing opgevangen in een 1.5 mL eppendorf. Dit staal werd zes keer verdund door de kolom na te spoelen met telkens een volume van 200 μl miliQ water. Dit geheel werd daarna gevortexed en gecentrifugeerd (50 sec aan 14000 rpm). Uit deze stalen werd 10 μl gepipetteerd in de uiteindelijke staalbuisjes en werd vervolgens 90 μl rhamnose (2.5 mM) toegevoegd. Deze rhamnose diende als een externe standaard. De stalen werden geladen in een *high performance anion exchange chromatography-Integrated pulsed amperometric detection* (HPAEC-IPAD; Dionex ics-3000) toestel en de concentraties van glucose, fructose en sucrose werden berekend gebaseerd op een Glu, Fru en Suc (GFS) standaard (10μM).

7. Statistische analyse

Voor de statistische analyse van de data werd beroep gedaan op RStudio (V. 3.3.3, © 2016 The R foundation for statistical computing) en JMP ® pro 14. Eerst werden de datasets gecontroleerd op mogelijke uitschieters. Aangezien er geen duidelijke redenen voorhanden waren die aantoonde dat bepaalde datapunten uitschieters konden zijn, werden alle datapunten behouden. Hierbij komt ook dat we in deze experimenten met natuurlijke systemen werken, waardoor veel variatie dan ook te verwachten was. Bij de meeste datasets was voldaan aan de voorwaarden voor homoscedasticiteit, waardoor de data niet getransformeerd moest worden.

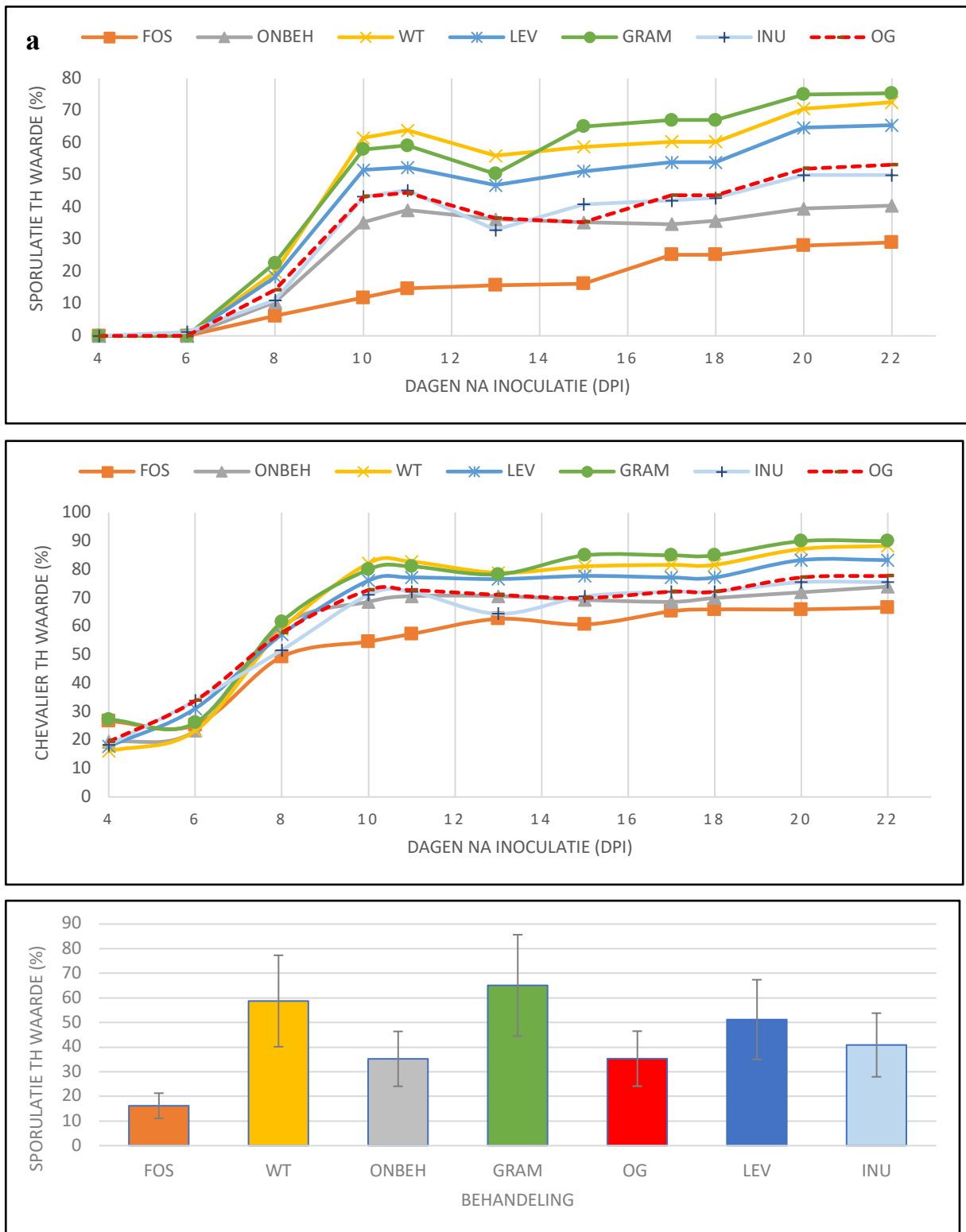
Bij enkele datasets werd een logaritmische of vierkantwortel transformatie uitgevoerd om deze problemen op te lossen. De verschillende variabelen waren niet met elkaar gecorreleerd door lage variantie inflatie factor (VIF) waarden. Vervolgens werd de normaliteit van de data getest met behulp van de Shapiro-Wilk normaliteitstest. Door een p-waarde kleiner dan het significantieniveau werd besloten dat de meeste datasets niet normaal verdeeld waren. Aangezien deze datasets niet normaal verdeeld waren, maakten we gebruik van een niet parametrische test, namelijk *Wilcoxon rank sum* test, om na te gaan of twee behandelingen significant van elkaar verschilden of niet. Bij normale datasets werd de *tukey HSD* test uitgevoerd. Er werd steeds een significantieniveau van $\alpha = 0.05$ gehanteerd, enkel als significante effecten afwezig waren, werd gekeken op een minder streng significantieniveau, namelijk $\alpha = 0.1$.

Resultaten en discussie

1. Inoculatie-experiment 1

1.1. Visuele evaluatie

De visuele evaluaties werden gestart vanaf het moment dat bij minstens 60 % van de planten per behandeling chlorose- en/of necrosesymptomen op de drie jongste bladeren macroscopisch zichtbaar werden met het oog. In het eerste experiment werd dit vier dagen na de inoculatie met conidiosporen van *V. inaequalis* bereikt. De sporulatiesymptomen, uitgedrukt in sporulatie TH waarden, werden op 8 dpi duidelijk zichtbaar met het oog en werden opgevolgd in de tijd voor alle behandelingen (Fig. 15a). De visuele evaluaties werden stopgezet op 22 dpi, omdat voor sommige behandelingen de bladeren al volledig geïnfecteerd waren en dus vervolgens zouden afvallen. De verschillen in Chevalier TH waarden tussen de verschillende behandelingen gebaseerd op blad 1, 2 en 3 zijn kleiner dan de verschillen in sporulatie TH waarden (Fig. 15a en b). Verder zien we ook dat de infectietrend voor alle behandelingen stagneert naar het einde van het experiment (Fig. 15b).



Figuur 15: De visuele evaluaties van het eerste experiment gebaseerd op blad 1, 2 en 3 voor alle behandelingen. a) De gemiddelde sporulatiegraden opgevolgd in de tijd. b) De gemiddelde Chevalier infectiegraden opgevolgd in de tijd. c) De gemiddelde sporulatiegraden op 15 dagen na inoculatie (15 dpi; Wilcoxon rank sum test, $\alpha = 0.05$; $N = 12$). Behandelingen zonder gemeenschappelijke letter zijn significant verschillend van elkaar op significantieniveau $\alpha = 0.05$ gedurende het hele experiment (a en b). Een asterisk wordt gebruikt om significante verschillen aan te duiden met water (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.005$; c). De foutbalken geven het gemiddelde ± 1 standaardfout weer.

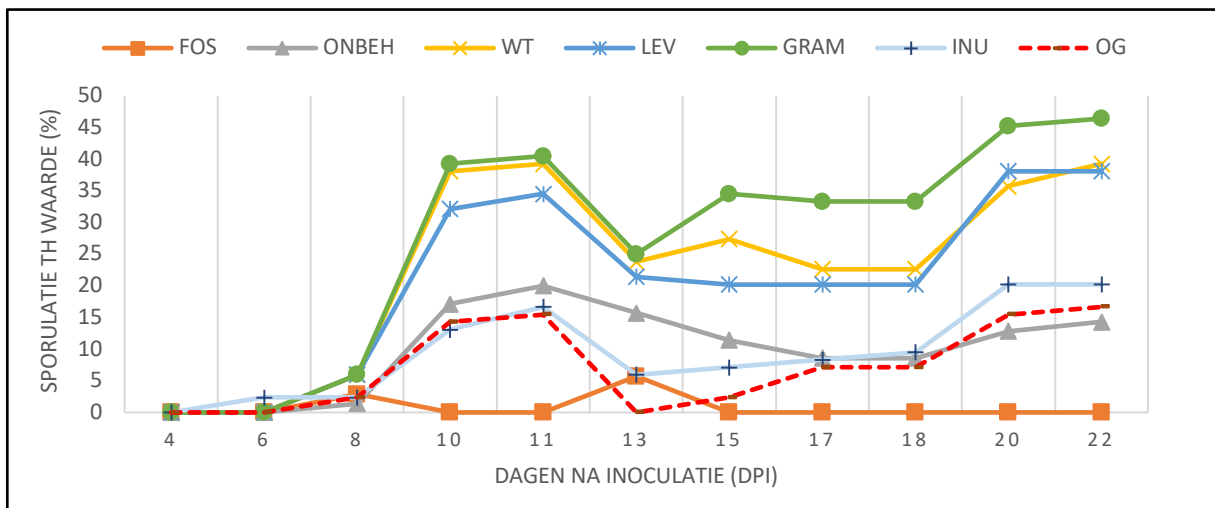
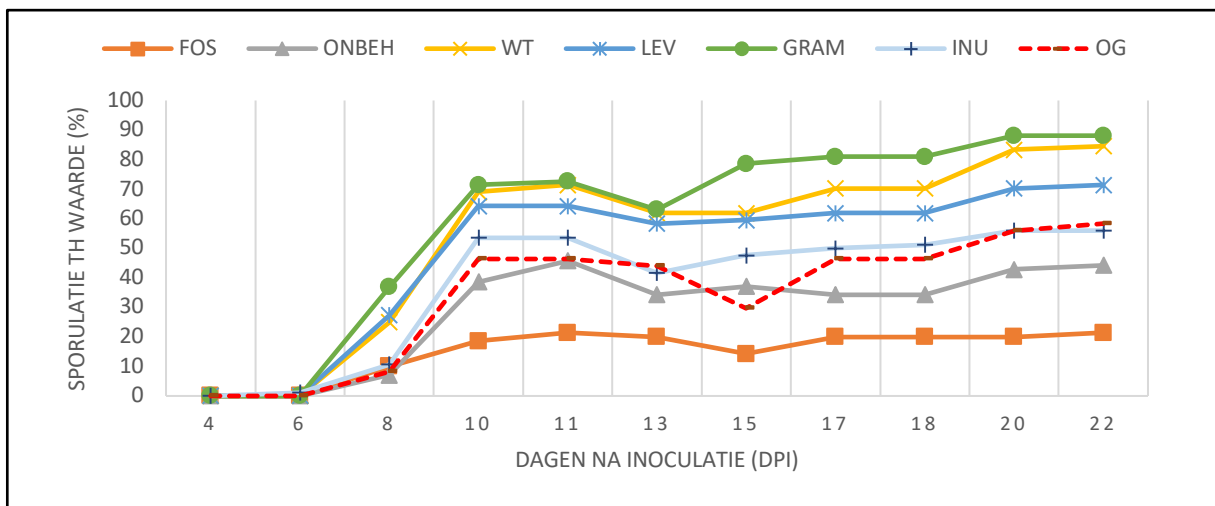
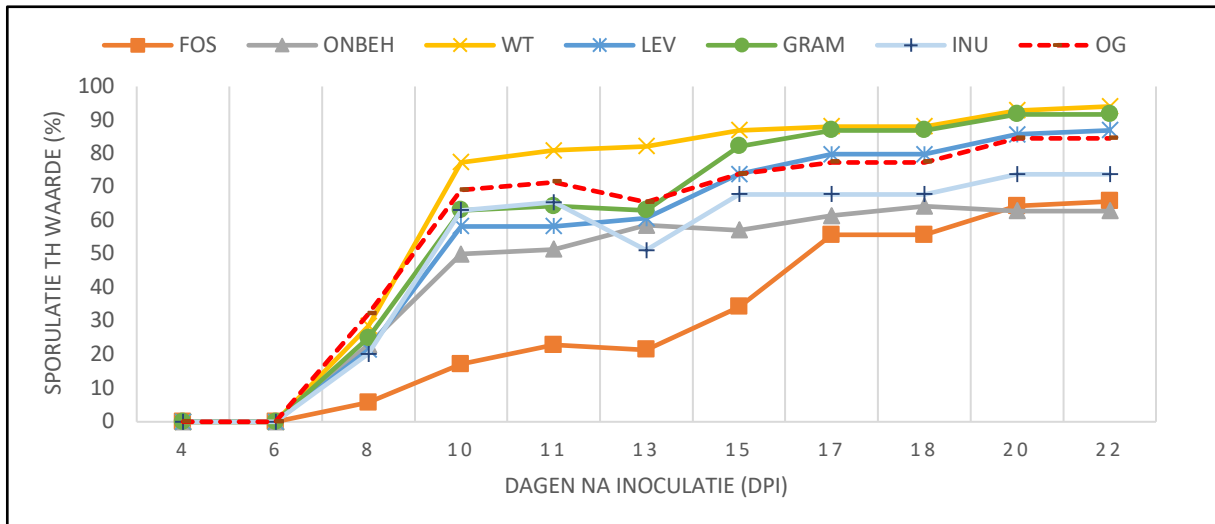
De infectiegraad van fosetyl-AI (FOS) behandelde planten ligt gedurende het hele experiment significant lager dan deze van de andere behandelingen. In het bijzonder ligt de gemiddelde sporulatie TH waarde gebaseerd op blad 1, 2 en 3 voor fosetyl-AI significant lager dan deze waarde voor de waterbehandelde planten (WT; Fig. 15a), wat de werking van de positieve controle in dit experiment bevestigt. Verder zien we dat inulinen (INU) zwakke potentiële primers zijn ten opzichte van graminanen (GRAM) en levanen (LEV), aangezien het sporulatiepercentage gemiddeld 50 % bedraagt op 22 dpi (Fig. 15a). Bovendien zijn de gemiddelde sporulatiepercentages van inulinenbehandelde planten significant verschillend van deze van levanen en graminanen geprimeerde bladeren. Daarnaast zijn er ook hoge sporulatiewaarden (gemiddeld 53 %) op 22 dpi bij planten behandeld met oligogalacturoniden (OG). Deze gemiddelde sporulatiepercentages zijn zelfs significant hoger dan deze bij fosetyl-AI behandelde bladeren. Bladeren behandeld met water bekomen zeer hoge sporulatie TH waarden (72.6 %) op 22 dpi (Fig. 15a), waardoor de behandeling een negatieve controle vormt. Echter bekomen bladeren geprimeerd met graminanen zelfs gemiddelde sporulatie TH waarden die hoger liggen dan deze waarde van de waterbehandelde bladeren (Fig. 15a). Ook levanen bereiken een gemiddelde sporulatie TH waarde van 65.5 % op 22 dpi. Onbehandelde planten (ONBEH) die geen priming behandeling kregen, maar wel geïnoculeerd werden met schimmelsporen, bekwamen lage sporulatie TH waarden (40.5 %). Verder toont de sporulatietrend vanaf 11 dpi een sterke daling (gemiddeld 14.8%; Fig. 15a). Bij een verdere analyse van de gemiddelde sporulatie TH waarden per afzonderlijk blad zien we dat de sporulatie TH waarden gebaseerd op blad 1 hoger liggen (Fig. 16a) ten opzichte van deze van de gemiddelde algemene sporulatie TH waarden gebaseerd op blad 1, 2 en 3 (Fig. 15a). Ook is er minder verschil tussen de verschillende behandelingen onderling te zien. Bij de gemiddelde sporulatie TH waarden gebaseerd op blad 2 kunnen dezelfde conclusies genomen worden ten aanzien van de verschillende behandelingen als uit Fig. 15a, enkel zijn de verschillen tussen de behandelingen in gemiddelde sporulatiepercentages (Fig. 16b) groter geworden ten opzichte van de gemiddelde sporulatie TH waarden gebaseerd op blad 1 (Fig. 16a). Verder zijn de verschillen in gemiddelde sporulatiepercentages gebaseerd op blad 3 tussen de zeven verschillende behandelingen (Fig. 16c) groter geworden dan deze gebaseerd op blad 2 (Fig. 16b). Ook zien we dat de sporulatie TH waarden in Fig. 16c de laagste waarden aantonen ten opzichte van de vorige figuren, terwijl de verschillen tussen de behandelingen hoger liggen dan deze gebaseerd op blad 2. Bovendien zijn bladeren geprimeerd op positie 3 met fosetyl-AI zelfs succesvol door een gemiddelde sporulatie TH waarde van 0 %. Uit Fig. 16d kunnen we duidelijk afleiden dat naarmate het blad ouder wordt, de gemiddelde sporulatie TH waarden

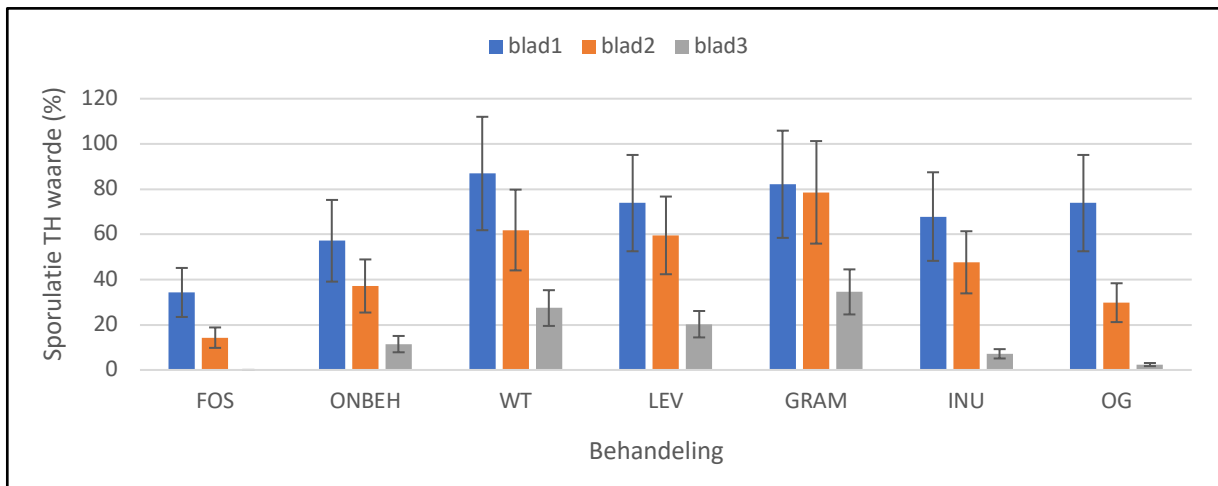
dalen

voor

alle

behandelingen.

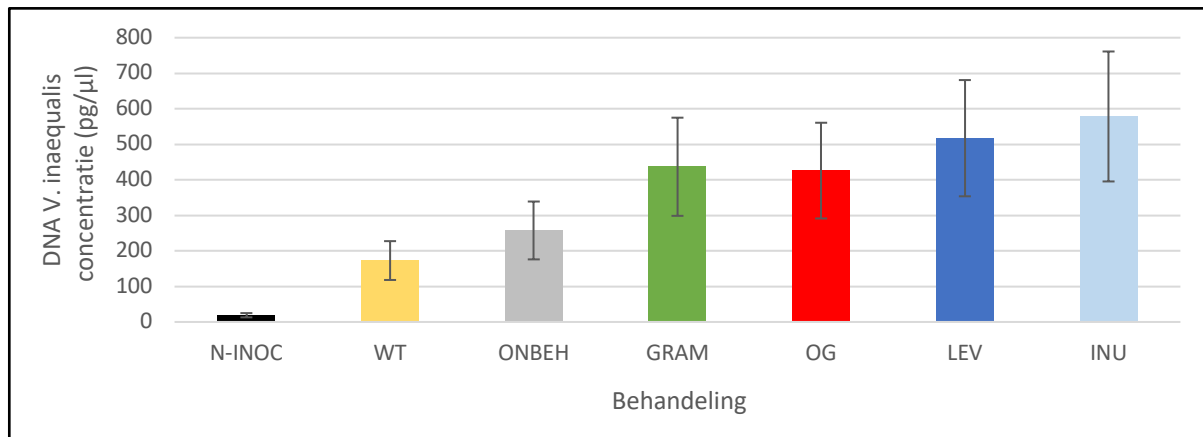




Figuur 16: De visuele evaluaties van het eerste experiment voor alle behandelingen. a) De gemiddelde sporulatiegraden gebaseerd op blad 1 opgevolgd in de tijd. b) De gemiddelde sporulatiegraden gebaseerd op blad 2 opgevolgd in de tijd. c) De gemiddelde sporulatiegraden gebaseerd op blad 3 opgevolgd in de tijd. d) De vergelijking van de gemiddelde sporulatiegraden in functie van blad 1, 2 en 3 op 15 dagen na inoculatie (15 dpi; Wilcoxon rank sum test, $\alpha = 0.05$; $N = 12$). Behandelingen zonder gemeenschappelijke letter zijn significant verschillend van elkaar op significantieniveau $\alpha = 0.05$ gedurende het hele experiment (a, b en c). Een asterisk wordt gebruikt om significante verschillen aan te duiden met water voor hetzelfde blad (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.005$; d). De foutbalken geven het gemiddelde ± 1 standaardfout weer.

1.2. Kwantificatie van *V. inaequalis*

De laagste hoeveelheid *V. inaequalis* DNA werd gemeten bij de niet geprimede en niet geïnoculeerde planten (18.9 pg/ μ l; Fig. 17). Volgens deze qPCR analyse zouden inulinenbehandelde planten gemiddeld 578.3 pg/ μ l bezitten, wat de hoogst bereikte concentratie is. Bladeren geprimed met levanen bevatten ook hoge concentraties aan *V. inaequalis* DNA (517.2 pg/ μ l). Daarentegen zouden waterbehandelde planten de laagste concentratie (172.8 pg/ μ l), net na de niet geprimede en niet geïnoculeerde planten bevatten. Ook in de onbehandelde bladstalen werden eerder lagere schimmelconcentraties (257.5 pg/ μ l) gemeten. De hoge hoeveelheid aan *V. inaequalis* DNA van bladeren geprimed met inulinen, levanen en OG waren significant hoger dan deze van de waterbehandelde bladeren.

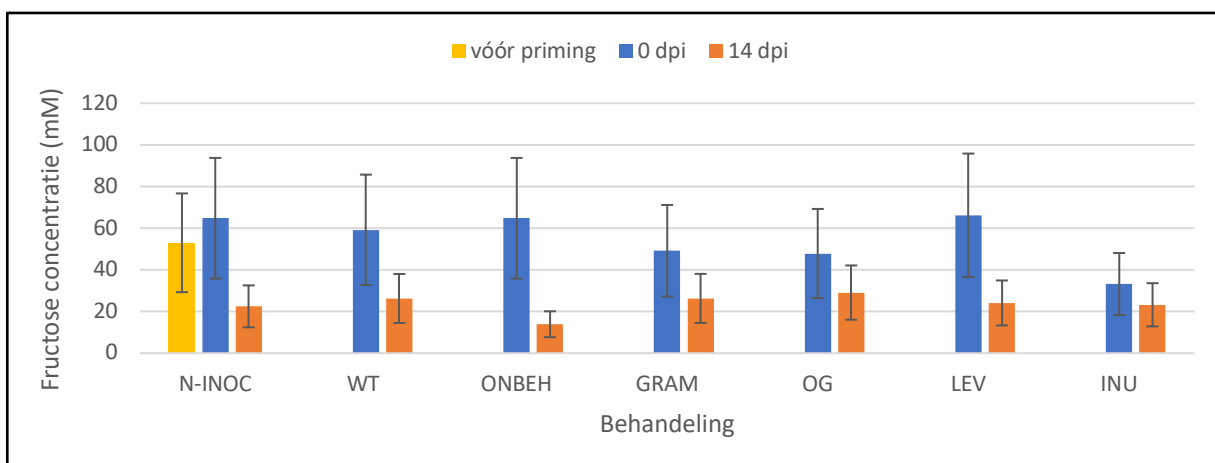
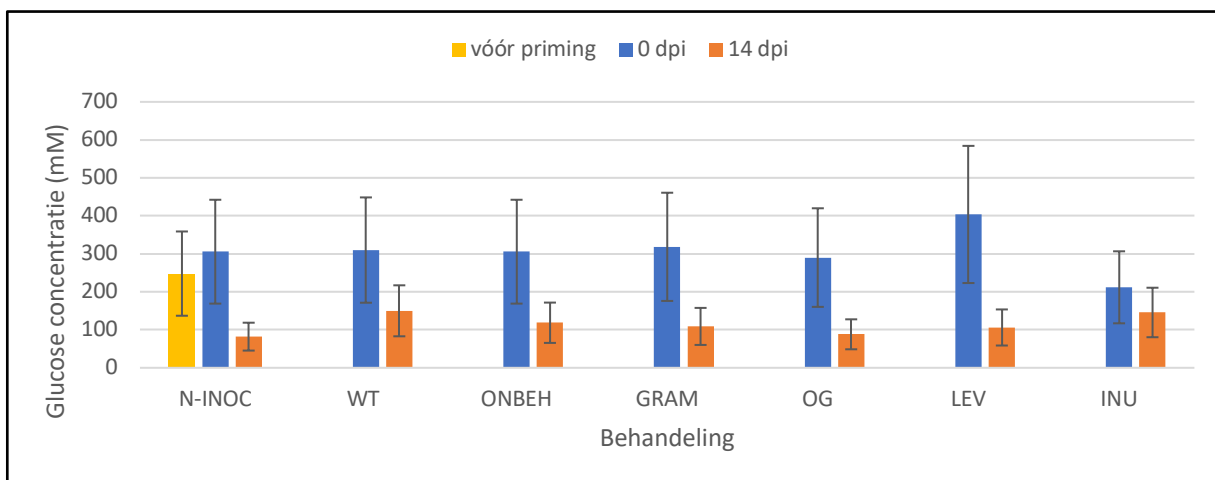
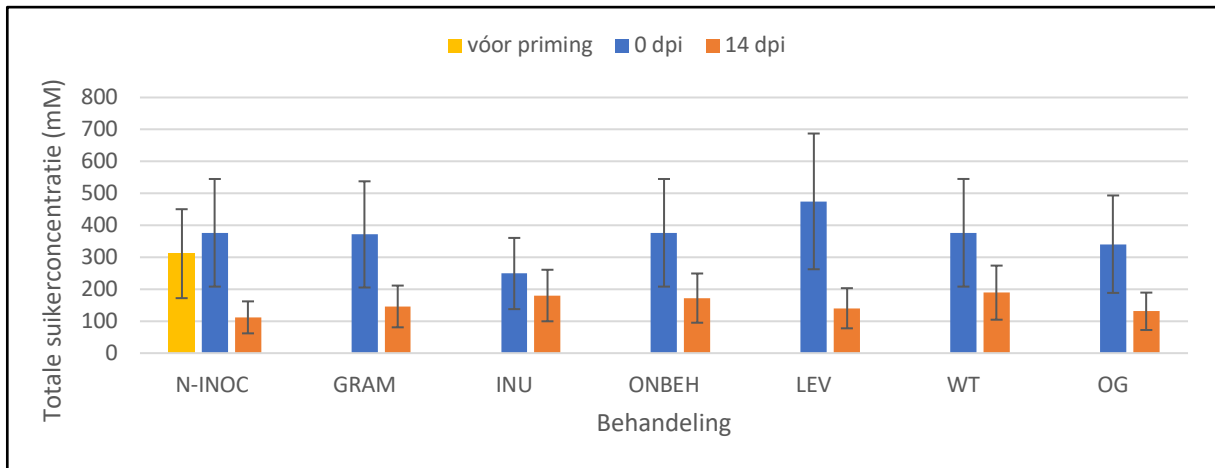


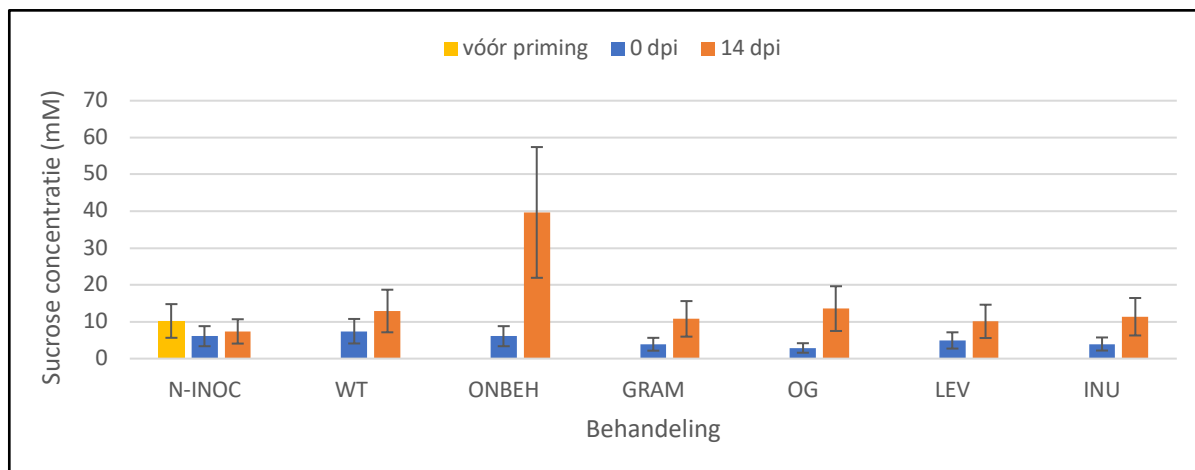
Figuur 17: De kwantificatie-analyse van het eerste experiment. De gemiddelde concentraties aan *V. inaequalis* DNA aanwezig in bladstalen gebaseerd op blad 1, 2 en 3 (± 20 mg) die genomen zijn op 14 dagen na de inoculatie (14 dpi; Tukey HSD test, $\alpha = 0.05$; $N = 10$). Behandelingen zonder gemeenschappelijke letter zijn significant verschillend van elkaar op significantieniveau $\alpha = 0.05$. De foutbalken geven het gemiddelde ± 1 standaardfout weer.

1.3. Suikeranalyse

De gemiddelde totale suikerconcentratie voor inulinenbehandelde planten op 0 dpi is sterk gedaald ten opzichte van deze waarde van planten vóór de priming, die dienden als startpunt (Fig 18a). Deze daling is vooral het gevolg van een daling van de glucose concentratie. Bij de overige behandelingen is de gemiddelde totale concentratie gestegen ten opzichte van de startwaarde. Enkel de glucose concentraties van bladeren geprimed met levanen zijn significant hoger dan de gemiddelde glucose concentratie van de bladstalen genomen vóór de priming (Fig. 18b). De niet geprimede en niet geïnoculeerde planten (N-INOC) deden in dit experiment dienst als een referentiegroep waarmee het effect van 100 % RH in de inoculatie tent onderzocht kon worden en het effect van priming bij de andere behandelingen op de suikerdynamiek vergeleken kon worden. Een controle staal van de niet geprimede en niet geïnoculeerde planten ontbreekt op 0 dpi bij de totale suiker, glucose, fructose en sucrose-analyses. Hierdoor werd de waarde van de onbehandelde planten overgenomen op 0 dpi, omdat er een tijdsverschil is van slechts 3 dagen tussen beide behandelingen. Op 14 dpi zien we dat de gemiddelde glucose en fructose concentraties van alle behandelingen gedaald zijn ten opzichte van hun gemiddelde beginconcentraties op 0 dpi (Fig. 18b en c). De gemiddelde glucose concentratie van bladeren verneveld met water is significant hoger dan deze van de niet geprimede en niet geïnoculeerde planten op 14 dpi. Verder geldt ook voor alle behandelingen dat hun sucrose concentratie gestegen is ten opzichte van deze waarde op 0 dpi. Op Fig. 18d is de sterkste significante stijging van 84.7% te zien bij de onbehandelde planten. Bij de niet geprimede en niet geïnoculeerde planten zien we een lagere sucrose concentratie in vergelijking met deze van alle andere

behandelingen op 14 dpi. Tot slot is de relatieve glucose-inhoud gedaald, terwijl de relatieve sucrose-inhoud gestegen is voor alle behandelingen op 14 dpi in vergelijking met deze waarden op 0 dpi (Tabel 1).





Figuur 18: Totaal suikergehalte, glucose, fructose en sucrose, bij bladstalen gebaseerd op blad 1, 2 en 3 vóór de priming, net vóór de inoculatie (0 dpi) en 14 dagen na inoculatie (14 dpi) met conidiosporen van *V. inaequalis* voor alle behandelingen van het eerste experiment. a) De gemiddelde totale suikerconcentraties (Wilcoxon rank sum test, $\alpha = 0.05$; $N = 5$). b) De gemiddelde glucose concentraties (Wilcoxon rank sum test, $\alpha = 0.05$; $N = 5$). c) De gemiddelde fructose concentraties (Wilcoxon rank sum test, $\alpha = 0.05$; $N = 5$). d) De gemiddelde sucrose concentraties (Wilcoxon rank sum test, $\alpha = 0.05$; $N = 5$). Voor de totale suiker, glucose, fructose en sucrose concentratie van de niet geprimede en niet geïnoculeerde planten op 0 dpi werden deze waarden overgenomen van de onbehandelde planten op 0 dpi. Bij 0 dpi wordt een asterisk gebruikt om significante verschillen aan te duiden met vóór priming. Bij 14 dpi wordt een asterisk gebruikt om significante verschillen aan te duiden met N-INOC op 14 dpi (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.005$). De foutbalken geven het gemiddelde ± 1 standaardfout weer.

Tabel 1: De vergelijking van de relatieve glucose, fructose en sucrose-inhoud voor alle behandelingen tussen vóór de priming, vóór de inoculatie (0 dpi) en 14 dagen na de inoculatie (14 dpi) met *V. inaequalis* van het eerste experiment. Voor de relatieve glucose, fructose en sucrose-inhoud van de niet geprimede en niet geïnoculeerde (N-INOC) planten op 0 dpi werden deze waarden overgenomen van de onbehandelde planten op 0 dpi.

	Relatieve glucose-inhoud (Glu/(Glu+Fru+Suc))		Relatieve fructose- inhoud (Fru/(Glu+Fru+Suc))		Relatieve sucrose- inhoud (Suc/(Glu+Fru+Suc))	
	0 dpi	14 dpi	0 dpi	14 dpi	0 dpi	14 dpi
vóór priming (-3 dpi)	75,1%		16,1%		3,1%	
N-INOC	81,2%	73,3%	17,2%	20,1%	1,6%	6,6%
WT	82,3%	79,3%	15,7%	13,9%	2,0%	6,8%
ONBEH	81,2%	68,9%	17,2%	8,1%	1,6%	23,0%
GRAM	85,7%	74,6%	13,2%	18,0%	1,0%	7,4%
OG	85,1%	67,4%	14,0%	22,2%	0,8%	10,4%
LEV	85,0%	75,6%	13,9%	17,2%	1,0%	7,2%
INU	85,1%	80,8%	13,3%	12,9%	1,6%	6,3%

1.4. Discussie

1.4.1. Effect van de priming op de infectie- en sporulatiegraden

Tussen de zeven behandelingen zijn de verschillen in gemiddelde Chevalier TH waarden kleiner dan deze verschillen in gemiddelde sporulatie TH waarden, omdat de Chevalier TH waarden naast de sporulatie TH waarden ook nog rekening houden met de chlorose en necrose TH waarden (Bijlage 2). Een eerste zaak wat direct opvalt bij Fig. 15a, is een daling vanaf 11 dpi van de gemiddelde sporulatie TH waarden bij bijna alle behandelingen. Dit komt doordat de drie jongste bladeren zich verder ontwikkelen naarmate het experiment vordert, en dus meer resistent worden tegen de pathogeen (Gusberti *et al.*, 2013).

Bij vergelijking tussen de drie geteste fructanen, zouden inulinen zwakke primers kunnen vormen voor fungiciden tegen *V. inaequalis*, aangezien hun gemiddelde sporulatiegraad significant lager ligt dan deze waarde van de waterbehandelde planten. Echter bedraagt de gemiddelde sporulatie TH waarde van de inulinebehandelde planten 40.9 % op 15 dpi, wat nog steeds een zware sporulatiedruk betekent. Volgens Arnault *et al.* (2016) zou een exogene toediening van fructose, het basismolecule van inuline, een primende werking hebben op appelvruchten tegen de mot *Cydia pomonella*. Deze primende werking kan recent verklaard worden door een mogelijke PAMP rol toegeschreven aan fructanen (Versluys *et al.*, 2017). Onze appelzaailingen blijken onvoldoende PR receptoren te hebben die deze inulinen herkennen, waardoor geen immuniteitsreacties geactiveerd kunnen worden. Daarentegen lijken inulinen de groei van *V. inaequalis* zelfs te stimuleren, aangezien een zeer hoge gemiddelde *V. inaequalis* DNA concentratie gemeten werd bij de kwantificatie-analyse van de schimmel. We vinden dus geen correlatie tussen sporulatie en concentratie van *V. inaequalis* DNA bij bladeren geprimed met inulinen, wat er zou kunnen op wijzen dat sporulatie en groei van de schimmel door verschillende mechanismen gereguleerd worden. Zo beschreven Osman en Valadon (1979) dat blauw licht (320-450 nm) zorgde voor een verhoogde sporulatie en vertraagde groei van *Verticillium agaricinum*. Inulinen lijken dus de groei van *V. inaequalis* te stimuleren, maar niet de sporulatie. De productie van levanen door *Erwinia amylovora*, veroorzaker van bacterievuur bij appel, verhoogt de virulentie van de bacterie (Koczan *et al.*, 2009), maar mogelijks kunnen levanen in appel als PAMP moleculen dienst doen en op die manier herkend worden door voorlopig nog onbekende PR receptoren, die het immuunsysteem van de plant primen tegen toekomstige pathogeeaanvallen. Recent werd door Versluys *et al.* (2017) voor fructanen een PAMP rol voorgesteld en ook bij Vaerten (2017) werd een primende werking van levanen vastgesteld. Deze schimmelreducerende werking van levanen werd niet teruggevonden in onze resultaten, maar daarentegen werd een grote gevoeligheid voor *V. inaequalis*

vastgesteld. Volgens de qPCR analyse zou de schimmelconcentratie van levanenbehandelde planten hoger liggen dan wat de visuele evaluatie aangeeft, wat aantoont dat er meer schimmel aanwezig was onder de cuticula dan wat zichtbaar was met het oog op het bladoppervlak. Bladeren geprimed met graminanen blijken eveneens zeer gevoelig aan *V. inaequalis* en vertonen dus geen primende werking in dit inoculatie-experiment. Hier vinden we wel een correlatie tussen sporulatie en schimmelgroei. Wellicht bevat onze kruising van appelzaailingen geen PR receptoren voor het fructaan type graminiaan of afbraakproducten hiervan. Nochtans werd een PAMP rol voorgesteld voor fructanen door Versluys *et al.* (2017).

Waterbehandelde planten bekwamen zeer hoge gemiddelde sporulatie TH waarden, waardoor ze als negatieve controle werkten (Fig. 15a). Echter is dit resultaat tegenstrijdig met de laagste gemiddelde *V. inaequalis* DNA concentratie die bij de kwantificatie-analyse van de schimmel geanalyseerd werd, waardoor geen correlatie tussen sporulatie en DNA concentratie te zien was. Het evenwicht van de osmotische status in de apoplast kan mogelijks verstoord worden door een hypo-osmotische schok die ontstaat door het sproeien van water op bladeren. Hierdoor dalen de suikerconcentraties sterk, wat leidt tot stimulatie van het anabolisch metabolisme, waardoor de concentraties opnieuw naar hun evenwicht zullen evolueren. Deze osmotische stress kan de biosynthese en signalering van ABA stimuleren (Wang *et al.*, 2011). Aangezien ABA de synthese van SA, het verdedigingshormoon tegen (hemi)biotrofen, inhibeert, zal dit een negatief effect hebben op het immuunsysteem van de plant (Yasuda *et al.*, 2008). Dit kan een verklaring bieden waarom waterbehandelde bladeren gevoeliger zijn voor *V. inaequalis* en dus goed werken als negatieve controle. Ook bij de inoculatie-experimenten van (Vaerten, 2017) werden hoge sporulatie TH waarden bekomen bij planten behandeld met water. Bij de onbehandelde planten is er geen onderdrukking van het verdedigingshormoon SA, waardoor de gemiddelde sporulatie en schimmelconcentratie lager liggen dan deze van de waterbehandelde planten. Een andere hypothese zou kunnen zijn dat water een invloed heeft op de ontwikkeling en dus ook op de leeftijd van bladeren. Zo zouden waterbehandelde planten minder snel verouderen en hierdoor later een ontogene resistentie opbouwen met als gevolg een grotere gevoeligheid voor pathogenen.

Bladeren behandeld met oligogalacturoniden vormen geen goede, tweede positieve controle bij appelzaailingen omwille van een hoge gevoeligheid voor *V. inaequalis*. Ook hier werd meer schimmel DNA gemeten in de bladstalen dan wat de visuele evaluatie aangeeft op 15 dpi. Om verdedigingsreacties te triggeren door OG, moet de polymerizatie graad van het ligand groot genoeg zijn (meer dan 10 residuen; Darvill *et al.*, 1992). Bovendien kan de celwand ook actieve OG'n tegenhouden, waardoor een te lage concentratie wordt bekomen in de cel en

vervolgens niet wordt overgegaan op expressie van verdedigingsgenen (Reymond *et al.*, 1995). Nochtans zou een exogene toediening van OG'n druiven beter beschermen tegen een infectie van *B. cinerea* (Aziz *et al.*, 2004). Een andere verklaring zou kunnen zijn dat onze appelzaailingen de receptorkinasen WAK1 en WAK2 niet bezitten, waardoor ze niet met OG kunnen binden en de verdedigingsreacties van de plant dus niet kunnen activeren (Brutus *et al.*, 2010). Planten behandeld met fosetyl-Al ondervinden naast een directe fungicide ook een primende werking. Deze indirecte, primende werking van Aliette® bestaat uit de dissociatie van de actieve stof fosetyl-Al in de plant tot ethyl fosfonaat, wat verder langzaam omgezet wordt tot fosforzuur. Zowel ethyl fosfonaat als fosforzuur leiden tot de stimulerende productie van verdedigingscomponenten zoals fytoalexinen en PR proteïnen in de plant (Guest *et al.*, 1988; Saindrenan *et al.*, 1988). Daniels (2013) besprak ook de significante reducerende werking van fosetyl-Al op de myceliumontwikkeling van *V. inaequalis* via qPCR analyse. Daarnaast stopt fosetyl-Al als fungicide de myceliumgroei en vermindert het de productie van sporen (Bayer CropScience, 2012). Fosetyl-Al heeft een half waarde tijd van 5 dagen bij een pH = 3 en een temperatuur van 22°C (FAO, 2013), waardoor ze geen blijvende werking heeft. Dit werd ook in ons experiment vastgesteld, aangezien we in Fig. 16a een tweede stijging kunnen waarnemen in de gemiddelde sporulatie TH waarde vanaf 13 dpi die uiteindelijk oploopt tot 65.7 %.

Zowel bij de visuele evaluatie als schimmelkwantificatie zijn onbehandelde planten weinig gevoelig aan *V. inaequalis*. Dit zou verklaard kunnen worden doordat de inoculatie bij de onbehandelde planten onvoldoende gelukt is en er op die manier een lager aantal sporen op de bladeren terecht kwamen of een lagere kieming van de schimmelsporen optrad en hierdoor de infectie op deze planten lager was. Deze hypothese lijkt weinig waarschijnlijk aangezien bij de andere behandelingen wel voldoende sporulatiesymptomen (> 50 %) waar te nemen waren op de geanalyseerde bladeren. Doordat de drie geteste fructanen en oligogalacturoniden hogere sporulatie TH waarden en *V. inaequalis* DNA concentraties (Fig. 19a) bekomen dan de onbehandelde planten, kunnen we de werking van priming in vraag stellen. Zo kan volgens Braam & Davis (1990) groei-inhibitie ontstaan bij planten na mechanische stimulatie. Hierdoor zou het besproeien van appelbladeren tijdens de primingbehandelingen als aanrakingen beschouwd kunnen worden, waardoor we in dit experiment te maken krijgen met twee effecten, namelijk priming en een waterschok effect. Tot slot kunnen de constante condities in de serre, die niet te vergelijken zijn met deze op het veld, de effectiviteit van de getest primingcomponenten in ons experiment beïnvloed hebben. Volgens Atkinson en Urwin (2012) kan variatie in abiotische stress (het gevolg van bijvoorbeeld hoge temperaturen in de serre)

een invloed hebben op de gevoeligheid van de plant voor pathogenen zoals *V. inaequalis*. Gedurende het experiment werd een constante dag-nacht temperatuur van respectievelijk 20-15°C aangehouden met geen grote temperatuurschommelingen, waardoor we deze stressfactor kunnen uitsluiten.

1.4.2. Effect van bladouderdom op de gevoeligheid voor *V. inaequalis*

Uit de resultaten van de visuele evaluaties zien we duidelijk dat hoe jonger, hoe gevoeliger het blad is voor *V. inaequalis* (Gusberti *et al.*, 2013). Pathogene schimmels vormen de infectieplaatsen om naar sinks om zo zichzelf te voorzien van nutriënten waaronder hexosen (Morkunas & Ratajzak, 2014). Jonge bladeren zijn van nature reeds sink organen en vormen bijgevolg een gunstige voedingsbodem voor de groei van de pathogeen bij inoculatie. Volgens MacHardy (1996) ontwikkelen oudere bladeren een ontogene resistentie waarbij de groei van de pathogeen onmiddellijk onderdrukt wordt, nadat de schimmel de cuticula probeert te doorbreken. Dit zal zich vertalen in een vertraagde ontwikkeling van de symptomen op blad 3 en meer variatie tussen de verschillende behandelingen onderling. Deze ontogene resistentie is waarschijnlijk het gevolg van een combinatie van verschillende verdedigingsmechanismen (Daniels, 2013). Zo zullen constitutieve eigenschappen van het blad veranderen zoals bijvoorbeeld een versterkte celwand en zijn sommige verdedigingseiwitten in hogere concentraties aanwezig bij oudere bladeren in vergelijking met deze in jongere bladeren. Van Loon *et al.* (2006) toonde aan dat β -1,3-glucanase, chitinase en endochitinase enkel te detecteren waren in oudere tabaksbladeren. Echter zou deze resistentie in verouderde bladeren verdwijnen (MacHardy, 1996).

Vervolgens liggen de sporulatie TH waarden gebaseerd op blad 1 voor planten behandeld met inulinen en OG hoger dan deze van de onbehandelde planten (Fig. 16d). Bij de sporulatiepercentages gebaseerd op blad 2 liggen deze waarden van inulinen en OG in de buurt van deze van de onbehandelde bladeren. Vervolgens zijn deze waarden zelfs beter in vergelijking met de onbehandelde planten. Hierdoor kunnen we besluiten dat inulinen en OG het waterschok effect helpen voorkomen in oudere bladeren. Daarnaast werd blad 1 pas gelabeld net vóór de inoculatie, waardoor we rekening moeten houden met het feit dat blad 1 op het moment van de priming (3 dagen vóór de inoculatie) nog gesloten en kleiner was dan op het moment van de inoculatie. Hierdoor is waarschijnlijk minder primingoplossing op blad 1 terechtgekomen en op die manier is hier een zwakker priming effect waar te nemen. Echter heeft fosetyl-Al een systemische werking, maar onduidelijkheid blijft over deze werking bij fructanen. Ook oligogalacturoniden worden beschouwd als lokale signalen omwille van hun

oligo-anionische structuur en hun beperkte bewegelijkheid in weefsels (Baydoun & Fry, 1985). Daarom is het beter te focussen op de verschillen in behandelingen gebaseerd op blad 3 waarbij de priming effecten sterker aanwezig zijn. Dit betekent immers niet om geen rekening te houden met de resultaten bij de jonge bladeren, want in de praktijk is het van belang zowel jonge als oude bladeren te beschermen tegen pathogenen.

1.4.3. Effect van primingbehandelingen op suikerconcentraties

In een initiële periode maken (hemi)biotrofen gebruik van lipiden en glycogeen die opgeslagen zitten in de conidiosporen en gaan ze pas nutriënten onttrekken van de gastheer in een later, prolifererend stadium (Both *et al.*, 2005), wat een invloed heeft op de endogene suikergehalten in de plant. Daarom worden de effecten die visueel of met behulp van qPCR te detecteren waren, vergeleken met wat er op het suikerniveau gebeurt. Morkunas & Rataczak (2014) beschreven dat hoge suikerniveaus in het bladweefsel van gele lupine de resistentie tegen pathogene schimmels zoals *Fusarium oxysporum*, ook een hemibiotroof, verbeteren. De plant gebruikt deze suikers als signalen om de aanmaak van ROS te stimuleren (Bolouri Moghaddam & van den Ende, 2012), voor de versteviging van de celwand, synthese van flavonoïden en voor de inductie van specifieke PR proteïnen (Morkunas & Rataczak, 2014). Drie dagen na de priming vinden we de sterkste stijging van de gemiddelde totale suikerconcentratie bij levanenbehandelde planten, maar deze vertoonden geen verbeterde resistentie in onze resultaten. Daarentegen vinden we op 14 dpi de grootste glucosedaling bij levanenbehandelde planten, wat verklaard kan worden door de grote consumptie van glucose, één van de voornaamste koolstofbronnen voor *V. inaequalis* (Berger *et al.*, 2007). Echter zien we ook bij de niet geprimede en niet geïnoculeerde planten, een endogene glucosedaling tussen 0 en 14 dpi, wat zou betekenen dat de plant ook zelf energie consumeert voor onderhoud en dus ook voor verdediging. Bovendien kunnen we afleiden uit bijlage 2a dat de gemiddelde chlorose TH waarden stijgen in functie van de tijd voor alle behandelingen, wat wijst op de afbraak van chlorofyl waarbij glucose verbruikt wordt (Christ & Hörtensteiner, 2014).

Uit onderzoek van Lecompte *et al.* (2017) blijkt dat een stijging aan relatieve fructose-inhoud in het bladweefsel de gevoeligheid voor de necrotrofe pathogeen *B. cinerea* significant verlaagt. In Tabel 1 vinden we dat de relatieve fructose-inhoud bij onbehandelde planten gestegen is in vergelijking met deze waarde van planten vóór de priming, waardoor een lagere gevoeligheid zou moeten bekomen worden voor de pathogeen volgens Lecompte *et al.* (2017). Dit wordt bevestigd door lage sporulatie TH waarden en een lage concentratie van het schimmel DNA. Een stijging van apoplastische suikers kan wijzen op de aanwezigheid van pathogenen

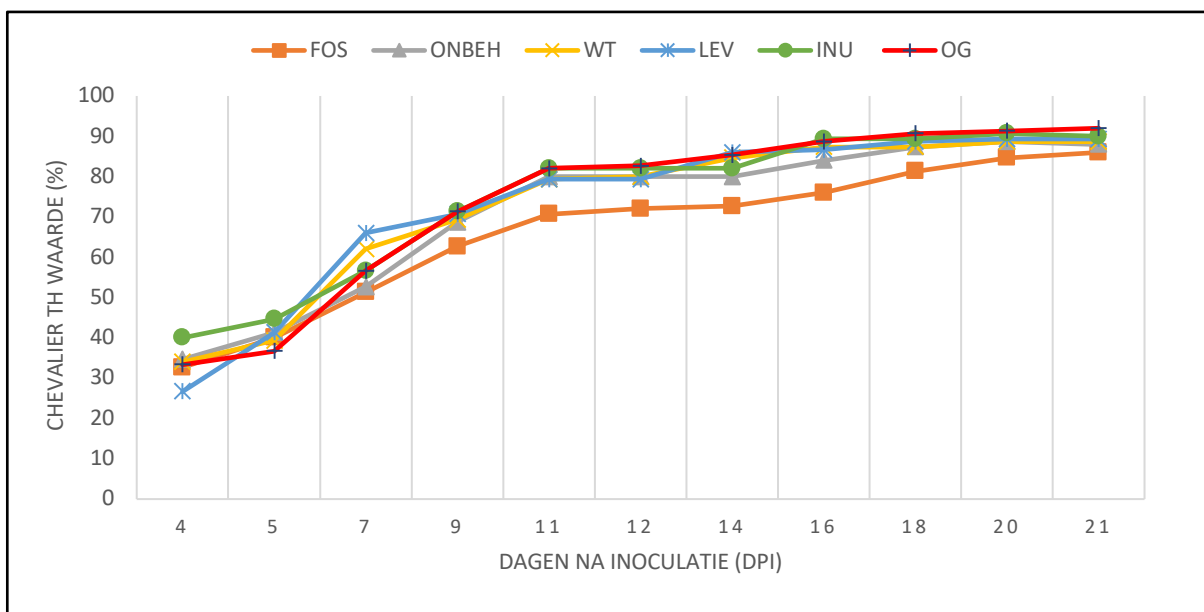
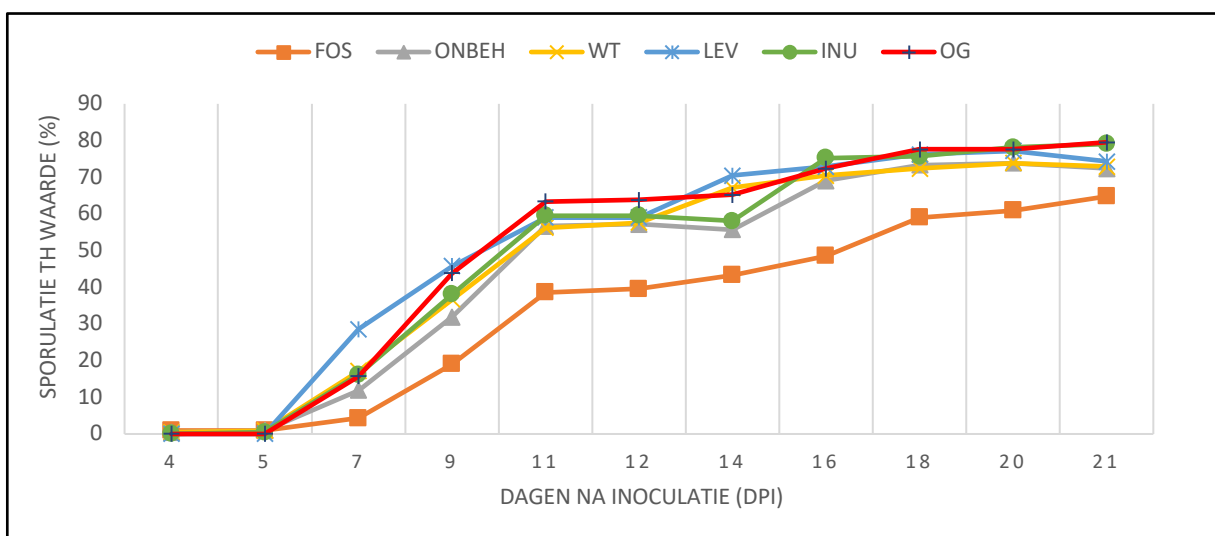
die met behulp van externe invertasen (INV'n) en Suc transporters, die tijdens de infectie omhoog gereguleerd worden, de Suc concentratie in de apoplast doet toenemen. Verder wordt Suc afgebroken door INV tot glucose en fructose (hexosen) die vervolgens opgenomen worden door de schimmel (Tauzin & Giardina, 2014). Naast de inductie van INV van de plant worden ook schimmel INV waargenomen bij de infectieplaats (Voegelé *et al.*, 2006). In de meeste bestudeerde pathosystemen bleek sucrose zich als een priming molecule te gedragen, waardoor een cascade aan signaleringsroutes geactiveerd werd zoals celwandversterking en fytohormonen om op die manier het immuunsysteem te activeren (Tauzin & Giardina, 2014). Ook een exogene toediening van sucrose isomeren palatinose en turanose en fluoro-sucrose (sucrose analoog) kunnen zich gedragen als elicitors om zo MAPK's te activeren, waardoor de plant verdedigingssignalen getriggerd worden (Sinha *et al.*, 2002). Een hogere expressie van PR genen in *Arabidopsis thaliana* na een exogene sucrose behandeling werd ook beschreven door Thibaud *et al.* (2004). Deze stijging aan sucrose vinden we het sterkst terug bij de onbehandelde planten op 14 dpi, wat zou betekenen dat de schimmel nu pas in zijn prolifererend stadium komt waarop de plant reageert en vervolgens leidt tot een lage concentratie van *V. inaequalis* DNA. Daarnaast kunnen suikers snel uit de apoplast opgenomen worden door de pathogeen zonder werkelijk te accumuleren in de apoplast (Yamada *et al.*, 2016). Zo kunnen fluxen veranderen zonder dat het suikergehalte beïnvloed wordt. Verder werd de N-INOC groep niet geïnoculeerd en bijgevolg kunnen pathogenen op deze appelbladeren sucrose niet omzetten tot hexosen voor eigen consumptie. Hierdoor zou een hogere sucrose concentratie verwacht worden bij de N-INOC groep ten opzichte van deze bij de andere behandelingen. Dit wordt echter door onze resultaten niet bevestigd.

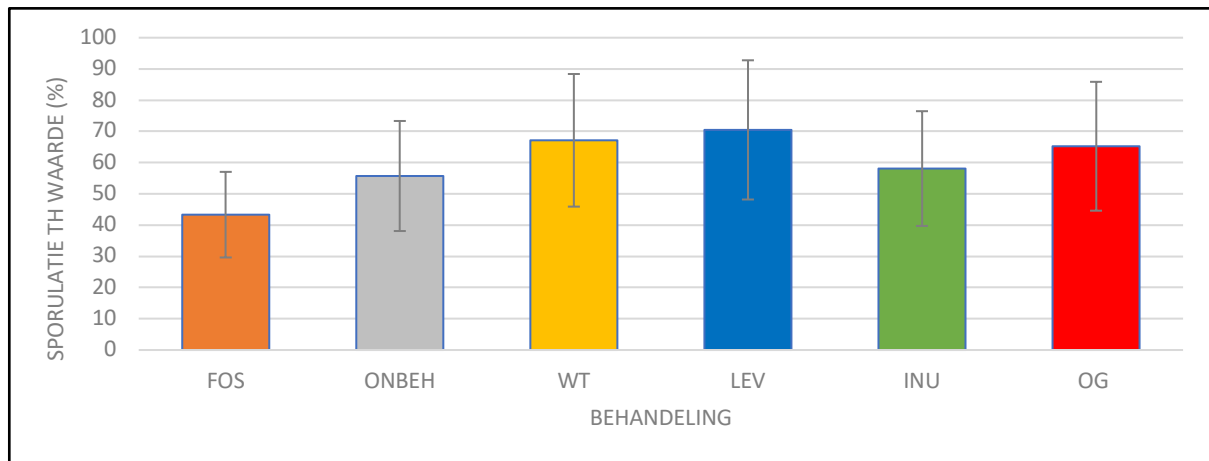
Tot slot kunnen de resultaten in ons experiment beïnvloed zijn door toevoeging van *Trichoderma harzianum* T-22 (Triatum-G) aan de potgrond om groeivermindering van planten te beperken na aantasting door *Pythium spp.* Na toediening koloniseert het mycelium van *T. harzianum* T22 de plantenwortels en onderdrukt het de ontwikkeling van bodempathogenen door te concurreren voor ruimte en nutriënten. Daarnaast kunnen verschillende *Trichoderma* soorten een geïnduceerde systemische resistentie (ISR) activeren, waardoor een plant beter beschermd is tegen toekomstige pathogeenaanvallen (Gamir *et al.*, 2014). Echter werd *T. harzianum* T-22 gebruikt bij alle planten, waardoor de priming effecten nog steeds zichtbaar zou moeten zijn.

2. Inoculatie-experiment 2

2.1. Visuele evaluatie

In dit tweede inoculatie-experiment werden de sporulatiesymptomen op 7 dpi duidelijk zichtbaar met het oog (Fig. 19a). De visuele evaluaties werden stopgezet op 21 dpi, omdat voor sommige behandelingen de bladeren al volledig geïnfecteerd waren en dus kort nadien zouden afvallen (Fig. 19a). De verschillen in Chevalier TH waarden tussen de verschillende behandelingen zijn kleiner dan deze in sporulatie TH waarden (Fig. 19a en b). Bovendien liggen de sporulatiecurven van alle behandelingen dicht bij elkaar met uitzonderlijk van fosetyl-Al (Fig. 19a).

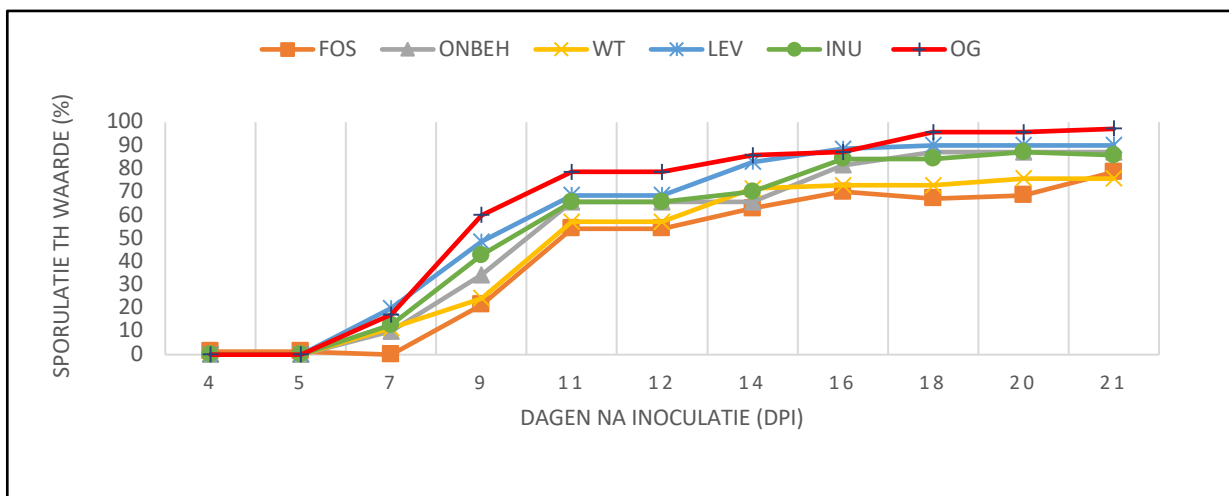
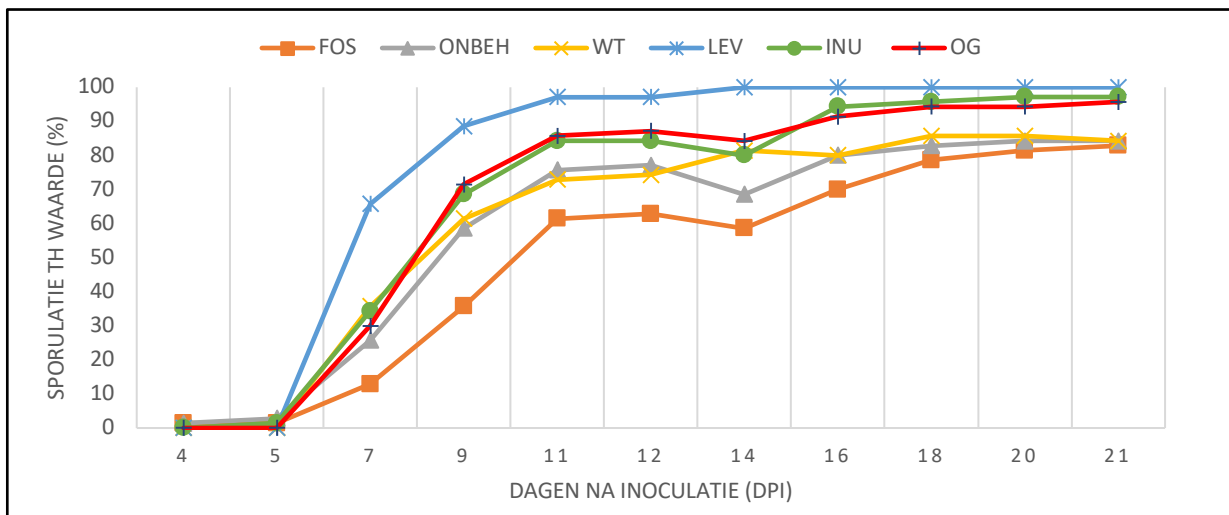


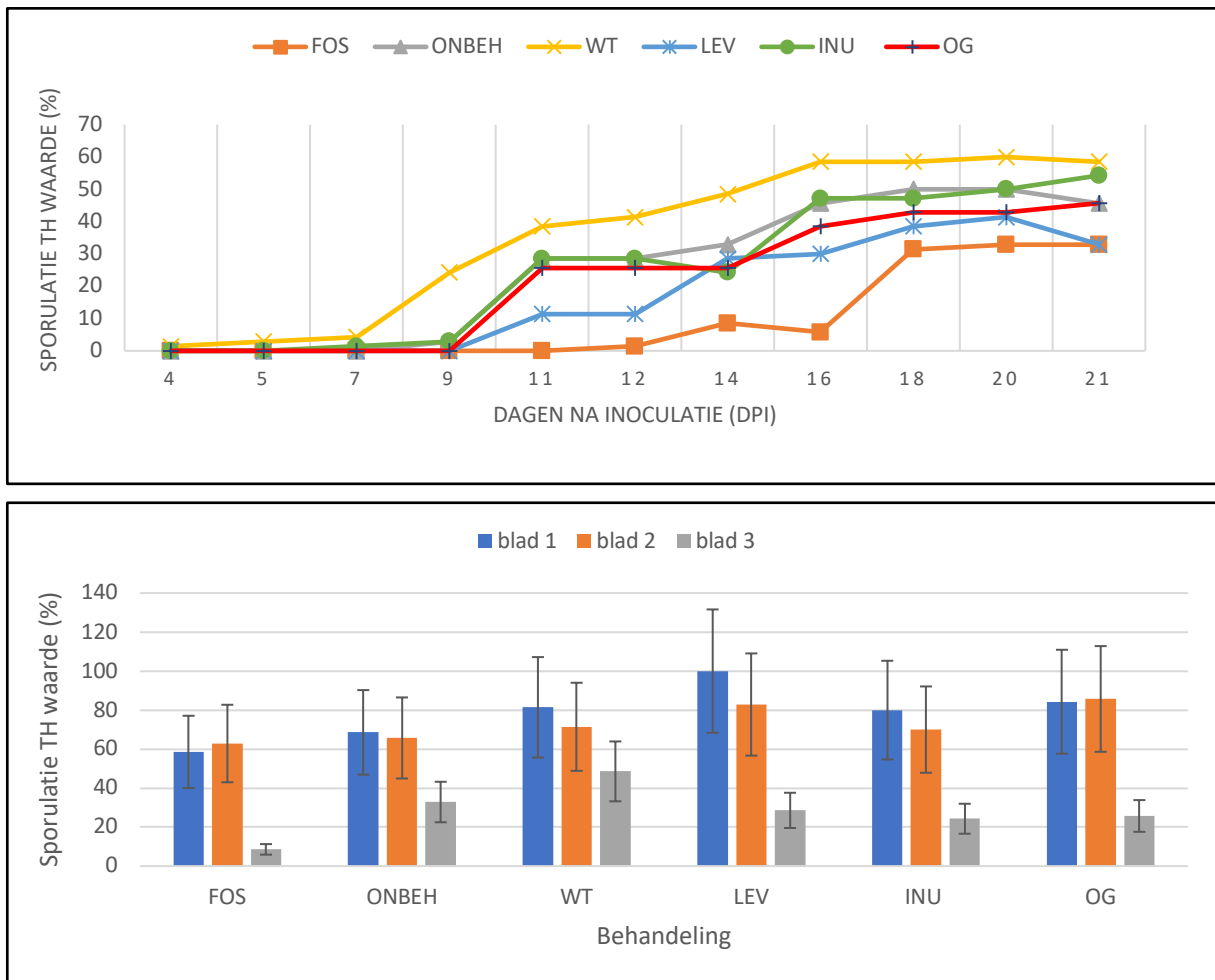


Figuur 19: De visuele evaluaties van het tweede experiment voor alle behandelingen. a) De gemiddelde sporulatiegraden gebaseerd blad 1, 2 en 3 opgevolgd in de tijd. b) De gemiddelde Chevalier infectiegraden gebaseerd blad 1, 2 en 3 opgevolgd in de tijd. c) De gemiddelde sporulatiegraden gebaseerd op blad 3 op 14 dagen na inoculatie (14 dpi; Wilcoxon rank sum test, $\alpha = 0.05$; $N = 10$) Behandelingen zonder gemeenschappelijke letter zijn significant verschillend van elkaar op significantieniveau $\alpha = 0.05$ gedurende het hele experiment (a en b). Een asterisk wordt gebruikt om significante verschillen aan te duiden met water (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.005$). Figuren zonder asterisk bevatten geen behandelingen die van elkaar verschillen op significantieniveau $\alpha = 0.05$ (c). De foutbalken geven het gemiddelde ± 1 standaardfout weer.

De infectie- en sporulatiegraad in fosetyl-AI behandelde planten ligt gedurende het hele experiment significant lager dan deze van de andere behandelingen (Fig. 19a en b), wat de werking van de positieve controle in dit experiment opnieuw bevestigt. Verder zien we dat planten behandeld met inulinen of levanen zeer zwakke *sweet immunity* primers vormen, aangezien het sporulatiepercentage respectievelijk gemiddeld 79.0 % en 74.3 % bedraagt op 21 dpi (Fig. 19a). Daarnaast zijn er ook hoge sporulatiewaarden (79.5 %) bij planten geprimed met OG teruggevonden. Ook niet geprimede, maar wel geïnoculeerde (onbehandeld) planten hebben hoge gemiddelde sporulatie TH waarden (72.4%). water behandelde planten bereikten eveneens hoge sporulatiepercentages, namelijk gemiddeld 72.9 % (Fig. 19a). Verder bemerken we dat er minder verschil waar te nemen is tussen de verschillende behandelingen voor de gemiddelde sporulatie TH waarden gebaseerd op blad 2 op 21 dpi (Fig. 20b) in vergelijking met deze waarden gebaseerd op blad 1 (Fig. 20a). Op Fig. 20b zien we dat bladeren geprimed met water en daarna geïnoculeerd werden, de laagste, terwijl OG'n behandelde planten de hoogste gemiddelde sporulatie TH waarde bekomen (Fig. 20b). De verschillen in gemiddelde sporulatie TH waarden gebaseerd op blad 3 tussen de zes verschillende behandelingen zijn groter geworden dan deze gebaseerd op blad 1 en 2 (Fig. 20a, b en c). Ook zien we dat de sporulatie TH waarden gebaseerd op blad 3 de laagste waarden aantonen ten opzichte van de vorige figuren, terwijl de verschillen groter zijn dan deze gebaseerd op blad 1 en 2 (Fig. 20a, b en c). In tegenstelling tot blad 2 hebben de waterbehandelde bladeren op positie 3 de hoogste

gemiddelde sporulatie TH waarde, namelijk 58.6 % (Fig. 20c). Verder zien we ook dat levanen samen met fosetyl-Al de laagste gemiddelde sporulatiepercentages (32.9 %) bereiken op 21 dpi. Echter is de gemiddelde sporulatie TH waarde van levanenbehandelde planten niet significant verschillend van deze waarde van de inulinenbehandelde planten. Bladeren behandeld met OG'n vormen opnieuw geen, goede positieve controle. De gemiddelde sporulatie TH waarden zijn zelfs significant hoger dan deze bij fosetyl-Al behandelde bladeren. Naarmate het blad ouder wordt, is er minder sporulatie op het bladoppervlak terug te vinden (Fig. 20d). Tot slot zien we kleine dalingen van gemiddelde sporulatie TH waarden tussen blad 1 en 2, vooral bij de planten behandeld met fosetyl-Al, OG en onbehandelde planten, waardoor beide bladeren ongeveer even gevoelig zijn aan *V. inaequalis*.



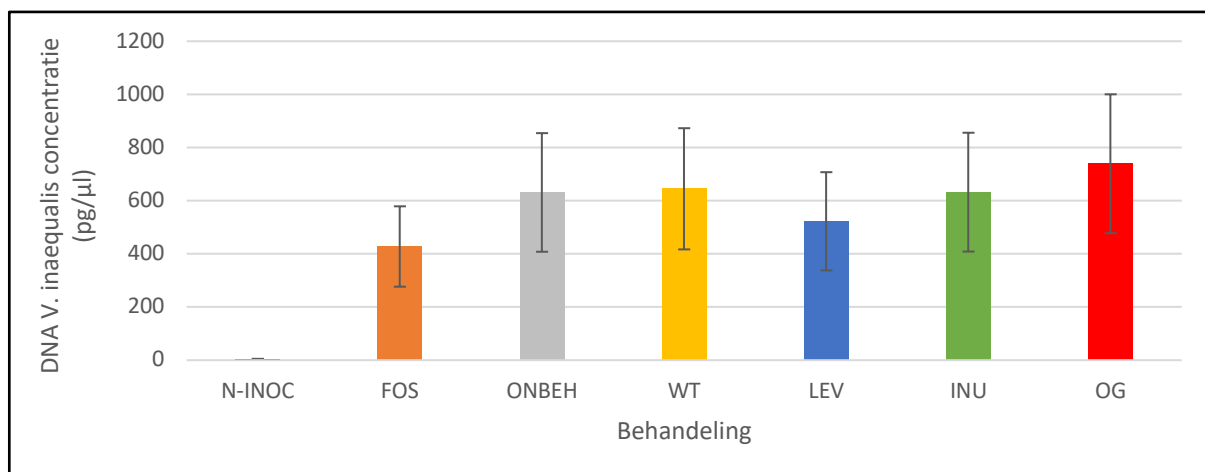


Figuur 20: De visuele evaluaties van het tweede experiment voor alle behandelingen. a) De gemiddelde sporulatiegraden gebaseerd op blad 1 opgevolgd in de tijd. b) De gemiddelde sporulatiegraden gebaseerd op blad 2 opgevolgd in de tijd. c) De gemiddelde sporulatiegraden gebaseerd op blad 3 opgevolgd in de tijd. d) De vergelijking van de gemiddelde sporulatiegraden in functie van blad 1, 2 en 3 op 14 dagen na inoculatie (14 dpi; Wilcoxon rank sum test, $\alpha = 0.05$; $N = 10$). Behandelingen zonder gemeenschappelijke letter zijn significant verschillend van elkaar op significantieniveau $\alpha = 0.05$ gedurende het hele experiment (a en b). Een asterisk wordt gebruikt om significante verschillen aan te duiden met water voor hetzelfde blad (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.005$). Figuren zonder asterisk bevatten geen behandelingen die van elkaar verschilden op significantieniveau $\alpha = 0.1$ (d). De foutbalken geven het gemiddelde ± 1 standaardfout weer.

2.2. Kwantificatie van *V. inaequalis*

Enkel bij de gemiddelde sporulatie TH waarden gebaseerd op blad 3 is er opnieuw meer verschil te bemerken tussen de verschillende behandelingen onderling door een sterker priming effect. Daarom werd besloten enkel de qPCR analyse uit te voeren voor de kwantificatie van het schimmel DNA op 14 dpi voor alle behandelingen gebaseerd op blad 3 ter bevestiging van de resultaten bij de visuele evaluatie. De laagste hoeveelheid *V. inaequalis* DNA is gemeten bij de niet geprimede en niet geïnoculeerde planten (Fig. 21). Bovendien is deze waarde significant verschillend van de waarden van alle andere behandelingen. Vervolgens zouden planten behandeld met OG'n gemiddeld 739.1 pg DNA/ μ l bezitten, wat de hoogste bereikte

concentratie is in dit experiment. Ook waterbehandelde planten vertonen hoge schimmelconcentraties (644.9 pg/ μ l) op 14 dpi. Daarentegen zouden bladeren geprimed met fosetyl-AI de laagste DNA concentratie (427.8 pg/ μ l; net na de niet geprimede en niet geïnoculeerde planten) bevatten (Fig. 21). De hoge concentratie van *V. inaequalis* DNA van OG behandelde planten was significant verschillend van deze van bladeren met fosetyl-AI behandeld. Tot slot werden bij levanenbehandelde planten eerder lage schimmelconcentraties (522.6 pg/ μ l) gemeten (Fig. 21).



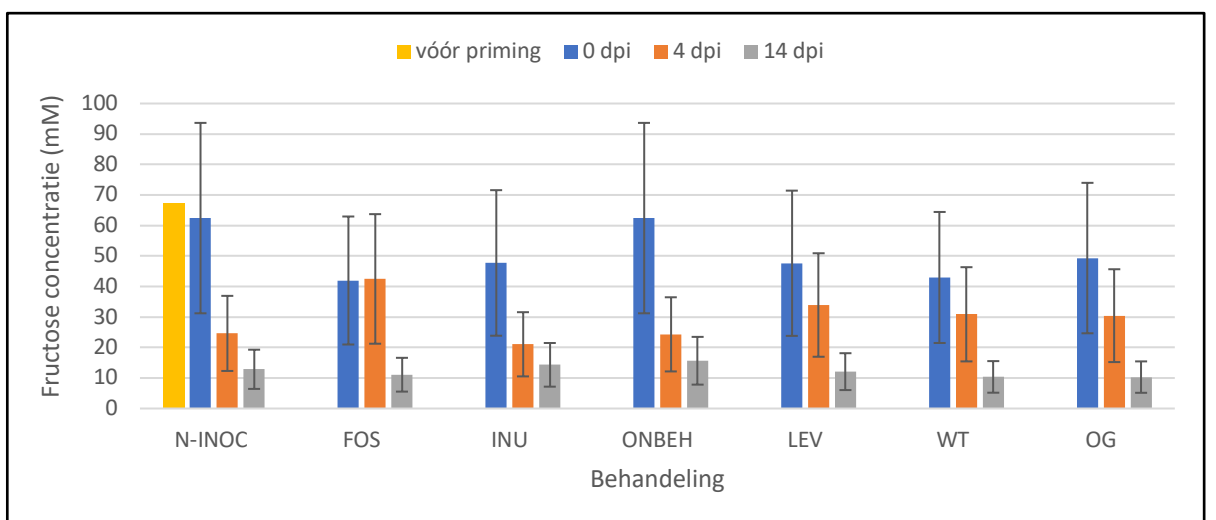
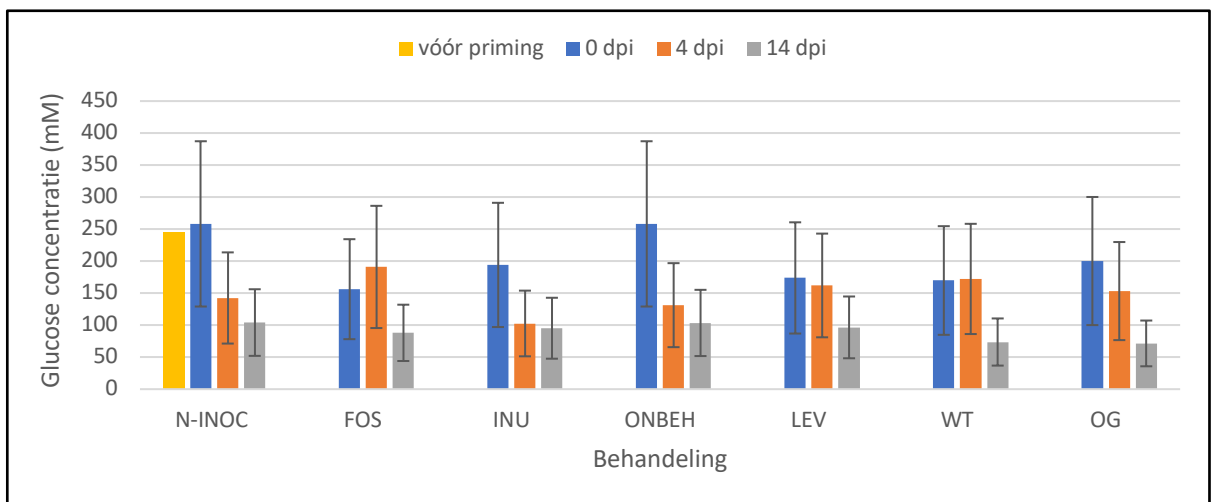
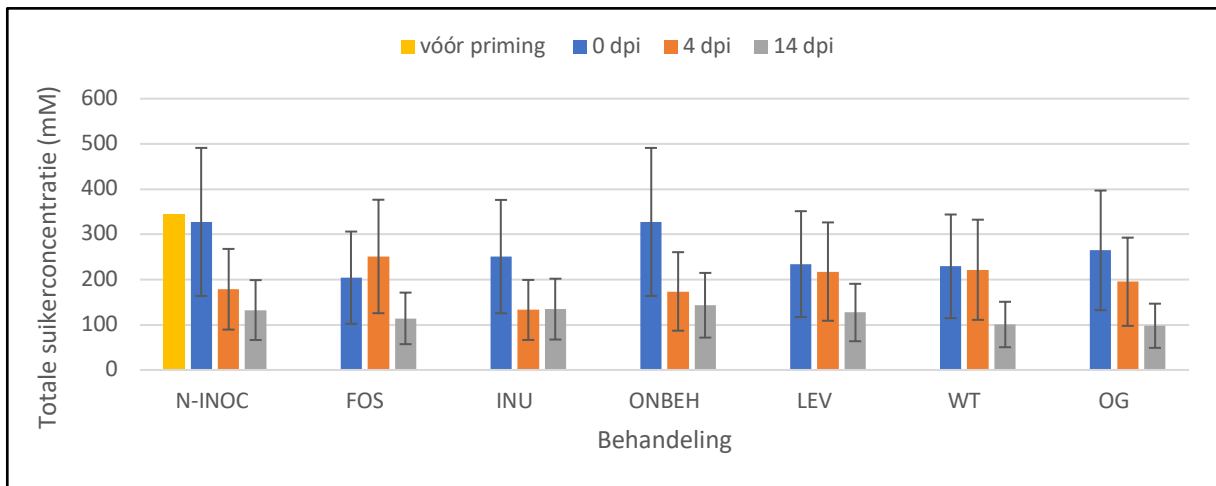
Figuur 21: De kwantificatie-analyse van het tweede experiment. De gemiddelde concentraties aan *V. inaequalis* DNA aanwezig in bladstalen gebaseerd op blad 3 (± 20 mg) die genomen zijn op 14 dagen na de inoculatie (14 dpi; Tukey HSD test, $\alpha = 0.05$; N = 8). Behandelingen zonder gemeenschappelijke letters zijn significant verschillend van elkaar op significantieniveau $\alpha = 0.05$. De foutbalken geven het gemiddelde ± 1 standaardfout weer.

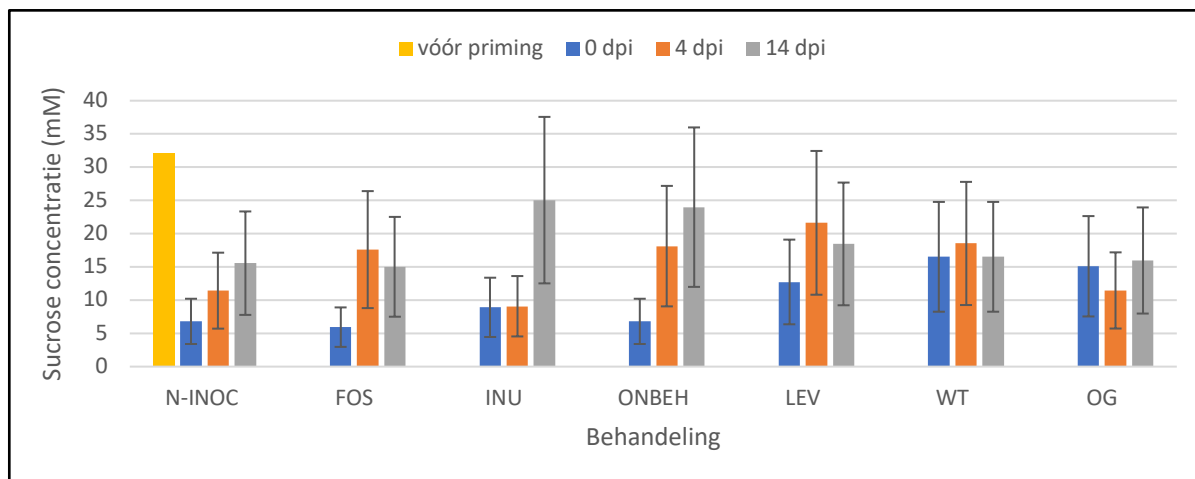
2.3. Suikeranalyse

De gemiddelde totale suikerconcentraties gebaseerd op blad 3 zijn voor alle behandelingen op 0 dpi gedaald ten opzichte van de gemiddelde totale suikerconcentratie bij planten vóór de primingbehandelingen (Fig. 22a). Deze dalingen zijn vooral te wijten aan een daling van glucose concentratie. Deze is het grootst bij fosetyl-AI behandelde planten, namelijk 36.2 % (Fig. 22b). De kleinste daling van gemiddelde glucose concentratie ten opzichte van deze waarde van de planten vóór de priming vinden we terug bij de onbehandelde planten, wat te verwachten was aangezien er enkel een tijdsverschil is van 3 dagen tussen beide behandelingen. Vervolgens zien we dat zowel de fructose als de sucrose concentraties voor alle behandelingen gedaald zijn ten opzicht van deze waarde van de planten vóór de priming (Fig. 22c en d). Een controle staal van de niet geprimede en niet geïnoculeerde planten ontbreekt op 0 dpi bij de totale suiker, glucose, fructose en sucrose-analyses. Hierdoor werd de waarde van de onbehandelde planten overgenomen op 0 dpi, omdat er een tijdsverschil is van slechts 3 dagen

tussen beide behandelingen. Op 4 dpi zien we dat de gemiddelde totale suikerconcentraties gebaseerd op blad 3 van alle behandelingen, behalve bij fosetyl-Al, gedaald zijn ten opzichte van hun gemiddelde totale beginconcentraties op 0 dpi (Fig. 22a). Deze resultaten vinden we ook terug bij de gemiddelde totale suikerconcentraties gebaseerd op blad 1 of 2 (zie bijlage 4a en 5a). De stijging in gemiddelde totale suikerconcentratie bij fosetyl-Al wordt veroorzaakt door een sterke glucose- en sucrosestijging (Fig. 22b en d). Vervolgens zien we op 4 dpi ook dat de gemiddelde sucrose concentraties gebaseerd op blad 3 voor planten behandeld met OG gedaald zijn ten opzichte van hun gemiddelde totale beginconcentraties op 0 dpi (Fig. 22c). Bij de rest van de behandelingen is hun gemiddelde sucrose concentratie gestegen in vergelijking met deze waarde op 0 dpi. Zo is de gemiddelde sucrose concentratie van levanenbehandelde planten significant hoger dan deze van de niet geprimede en niet geïnoculeerde planten. Bovendien is voor alle behandelingen de gemiddelde relatieve sucrose-inhoud gestegen ten opzichte van deze waarde op 0 dpi (Tabel 2).

Op 14 dpi zijn de gemiddelde glucose en fructose concentraties verder gedaald in vergelijking met deze op 4 dpi voor alle behandelingen (Fig. 22a en b). Bij bladeren behandeld met water en OG'n zien we een lagere gemiddelde glucose concentratie in vergelijking met deze waarden van de andere behandelingen op 14 dpi, behalve voor fosetyl-Al (Fig. 22b). De gemiddelde relatieve glucose-inhoud is bij fosetyl-Al en levanen gestegen ten opzichte van deze waarde op 4 dpi (Tabel 2). Bij de niet geprimede en niet geïnoculeerde, inulinebehandelde, onbehandelde en OG behandelde planten is op 14 dpi ook een sucrosestijging te zien (Fig. 22d). Er is enkel een significant verschil tussen de sucrose waarde van de onbehandelde planten en deze van de niet geprimede en niet geïnoculeerde planten. Tot slot zien we op 14 dpi dat de gemiddelde relatieve sucrose-inhoud lager ligt voor fosetyl-Al en levanenbehandelde planten ten opzichte van deze waarden voor de overige behandelingen, uitgezonderd de niet geprimede en niet geïnoculeerde planten (Tabel 2). De niet geprimede en niet geïnoculeerde planten (N-INOC) deden in dit experiment opnieuw dienst als een referentiegroep waarmee het effect van 100 % RH in de inoculatie tent onderzocht kon worden en het effect van priming bij de andere behandelingen op de suikerdynamiek vergeleken kon worden. Deze referentiegroep toont aan dat alle priming behandelingen een hoger sucrose gehalte hebben in vergelijking met de referentiegroep op 14 dpi.





Figuur 22: Totaal suikergehalte, glucose, fructose en sucrose, bij bladstalen gebaseerd op blad 3 vóór de priming, net vóór de inoculatie (0 dpi), 4 en 14 dagen na inoculatie (4 en 14 dpi) met conidiosporen van *V. inaequalis* voor alle behandelingen van het tweede experiment. a) De gemiddelde totale suikerconcentraties (Wilcoxon rank sum test, $\alpha = 0.05$; $N = 4$). b) De gemiddelde glucose concentraties (Wilcoxon rank sum test, $\alpha = 0.05$; $N = 4$). c) De gemiddelde fructose concentraties (Wilcoxon rank sum test, $\alpha = 0.05$; $N = 4$). d) De gemiddelde sucrose concentraties (Wilcoxon rank sum test, $\alpha = 0.05$; $N = 4$). Voor de totale suiker, glucose, fructose en sucrose concentratie van de niet geprimede en niet geïnoculeerde planten op 0 dpi werden deze waarden overgenomen van de onbehandelde planten op 0 dpi. Er was maar één datawaarde beschikbaar voor de totale suiker, glucose, fructose en sucrose concentratie van de planten vóór priming, waardoor er geen foutenbalk kan weergegeven worden. Bij 0 dpi wordt een asterisk gebruikt om significante verschillen aan te duiden met vóór priming. Bij 14 dpi wordt een asterisk gebruikt om significante verschillen aan te duiden met N-INOC op 14 dpi (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.005$). De foutbalken geven het gemiddelde ± 1 standaardfout weer.

Tabel 2: De vergelijking van de relatieve glucose, fructose en sucrose-inhoud voor alle behandelingen tussen vóór de priming, vóór de inoculatie (0 dpi), 4 en 14 dagen na de inoculatie (4 en 14 dpi) met *V. inaequalis* van het tweede experiment. Voor de relatieve glucose, fructose en sucrose-inhoud van de niet geprimede en niet geïnoculeerde (N-INOC) planten op 0 dpi werden deze waarden overgenomen van de onbehandelde planten op 0 dpi.

	Relatieve glucose-inhoud (Glu/(Glu+Fru+Suc))			Relatieve fructose-inhoud (Fru/(Glu+Fru+Suc))			Relatieve sucrose-inhoud (Suc/(Glu+Fru+Suc))			
	vóór priming (-3 dpi)	0 dpi	4 dpi	14dpi	0 dpi	4 dpi	14 dpi	0 dpi	4 dpi	14 dpi
N-INOC	71,1%	77,4%	79,8%	78,5%	19,0%	13,8%	9,7%	3,6%	6,4%	11,7%
WT		76,5%	77,7%	73,3%	20,6%	13,9%	10,3%	2,9%	8,4%	16,4%
ONBEH		77,4%	75,6%	72,3%	19,0%	14,0%	10,9%	3,6%	10,4%	16,8%
FOS		78,9%	76,1%	77,1%	19,1%	16,9%	9,7%	2,1%	7,0%	13,2%
OG		74,2%	78,5%	73,1%	20,3%	15,6%	10,5%	5,4%	5,9%	16,3%
LEV		74,1%	74,5%	76,0%	18,7%	15,6%	9,5%	7,2%	9,9%	14,5%
INU		75,7%	77,3%	70,7%	18,6%	15,9%	10,6%	5,7%	6,8%	18,6%

2.4. Discussie

2.4.1. Effect van de priming op de infectie- en sporulatiegraden

In het algemeen waren meer sporulatiesymptomen zichtbaar bij alle behandelingen in het tweede experiment, behalve bij de waterbehandelde planten, in vergelijking met het eerste experiment. De appelplanten in het tweede experiment zijn met andere woorden meer gevoelig voor appelschurft in vergelijking met het eerste experiment. Dit kan verklaard worden door de ouderdom van planten die een rol spelen in de uiting van sporulatiesymptomen met verminderde symptomen in functie van de ouderdom (Reuveni *et al.*, 1986; Bonde *et al.*, 2012). De leeftijd van de geprimeerde planten van het tweede experiment was lager dan deze van het eerste experiment, waardoor deze planten gevoeliger zijn voor pathogenen. De planten in het tweede experiment werden opgegroeid onder gecontroleerde omstandigheden i.e. dag-nacht temperatuur van respectievelijk 21-19.5°C. Deze temperaturen lagen hoger dan deze in het eerste experiment (20-15°C), waardoor een snellere groei van de zaailingen bekomen werd en hierdoor met jongere zaailingen gewerkt werd. De verschillen in Chevalier en sporulatie TH waarden gebaseerd op blad 1, 2 en 3 (Fig. 19a en b) tussen de verschillende behandelingen, behalve voor fosetyl-Al behandelde planten, zijn kleiner ten opzichte van deze in het eerste experiment (Fig. 15a en b). Dit kan toegeschreven worden aan enerzijds de lagere sporenconcentratie en anderzijds de jongere leeftijd van de planten in het tweede experiment, waardoor een hogere sporulatiedruk aanwezig was op de appelbladeren en vervolgens zwakkere priming effecten tussen de verschillende behandelingen zichtbaar waren. Verder zijn blad 1 en 2 ook ongeveer even gevoelig door gelijke sporulatiepercentages, waardoor hier ook moeilijk priming verschillen waargenomen kunnen worden (Fig. 20d).

In dit experiment lijkt de invloed van het eventuele waterschok effect minder duidelijk, waardoor we de primingeffecten beter kunnen evalueren. Bij vergelijking tussen de twee geteste fructanen, namelijk inulinen en levanen, gebaseerd op blad 3, zouden levanen als potentiële priming moleculen gebruikt kunnen worden, mogelijk als gevolg van hun PAMP rol (Versluys *et al.*, 2017). Dit negatief effect op de ontwikkeling van het mycelium was echter kleiner in vergelijking met fosetyl-Al. Daarnaast ligt de schimmel DNA concentratie van levanen lager dan deze van de onbehandelde en waterbehandelde planten, wat een mogelijk priming effect weergeeft. Verder zijn planten behandeld met inulinen erg gevoelig aan *V. inaequalis*, wat blijkt uit de gemiddelde hoge DNA concentraties (632.3 pg/μl) van deze schimmel (Fig. 21), terwijl de gemiddelde sporulatie TH waarden bij 14 dpi nochtans een laag percentage (24.3%) aantoont (Fig. 19c). Inulinen lijken als voedingsbron gebruikt te worden door de schimmel. Zo kunnen fructanen als prebiotica beschouwd worden, omdat ze selectief gunstige darmbacteriën

stimuleren zoals bijvoorbeeld *lactobacilli* (van den Ende et al, 2004). Nochtans zou volgens Arnault *et al.* (2016) een exogene toediening van fructose, het basismolecule van inuline, een primende werking hebben op appelvruchten tegen de mot *C. pomonella*. De resultaten van sporulatie en schimmelkwantificatie van de onbehandelde planten liggen in de lijn van de verwachtingen, aangezien onbehandelde planten geen potentieel priming molecule toegediend kregen en dus gevoeliger zijn voor pathogenen net zoals de negatieve controle (waterpriming). Een behandeling met water op de bladeren kan osmotische stress creëren, waardoor de biosynthese van ABA gestimuleerd wordt, wat een negatieve invloed heeft op het verdedigingssysteem van deze bladeren (Yasuda *et al.*, 2008). Bij de onbehandelde planten is er geen onderdrukking van het verdedigingshormoon SA, waardoor de sporulatie en schimmelconcentratie lager liggen dan deze van de waterbehandelde planten. Tot slot vormen bladeren geprimed met oligogalacturoniden opnieuw geen goede, tweede positieve controle door de hoge concentratie van *V. inaequalis* DNA in de bladstalen, terwijl de sporulatie TH waarde eerder laag was (25.7 %). Nochtans zou een exogene toediening van OG'n druiven beter beschermen tegen een infectie van *B. cinerea* (Aziz *et al.*, 2004). We vinden geen correlatie tussen de sporulatie en schimmelkwantificatie voor inulinen en OG, wat weeral doet vermoeden dat beide mechanismen niet op dezelfde manier gereguleerd worden. Bij de overige behandelingen was er wel een correlatie te zien tussen sporulatie en DNA concentraties van *V. inaequalis*. Fosetyl-Al toont opnieuw een schimmelreducerende werking in dit experiment, wat toegeschreven kan worden aan de hogere expressie van fytoalexinen en PR proteïnen (Guest *et al.*, 1988; Saindrenan *et al.*, 1988).

2.4.2. Effect van bladouderdom op de gevoeligheid voor *V. inaequalis*

Op basis van de resultaten van de visuele evaluaties zien we eveneens de ontogene resistentie bij adulte bladeren (blad 3) door lagere gemiddelde sporulatie TH waarden bij alle behandelingen. Blad 1 is het jongste blad en opnieuw het meest gevoelig aan *V. inaequalis*. Vervolgens liggen de sporulatie TH waarden gebaseerd op blad 1 voor planten behandeld met levanen en OG hoger dan deze van de onbehandelde planten (Fig. 16d). Bij de sporulatiepercentages gebaseerd op blad 2 liggen deze waarden van levanen en OG in de buurt van deze van de onbehandelde bladeren. Verder zijn deze waarden zelfs beter in vergelijking met de onbehandelde planten. Hierdoor kunnen we besluiten dat levanen en OG het waterschok effect helpen voorkomen in oudere bladeren.

2.4.3. Effect van primingbehandelingen op suikerconcentraties

Bij bladeren geprimed met OG zien we een hoge gemiddelde glucose concentratie op 0 dpi, waardoor de schimmel goed op deze bladeren kan groeien, aangezien glucose één van de verkozen koolstofbronnen is door *V. inaequalis* (Berger *et al.*, 2007). Dit werd ook bevestigd door hogere schimmelconcentraties gemeten in deze bladstalen op 14 dpi (Fig. 21). Daarnaast vinden we de grootste glucosedaling bij fosetyl-AI behandelde planten drie dagen na de priming, waardoor minder glucose kan opgenomen worden door de schimmel en daarom een negatief effect heeft op de schimmelontwikkeling op het blad. Dit wordt bevestigd door de visuele evaluatie en kwantificatie-analyse. Bovendien is de gemiddelde relatieve fructose-inhoud van fosetyl-AI behandelde bladeren hoger in vergelijking met deze waarden van de andere behandelingen op 4 dpi, wat een verklaring kan bieden voor de hogere resistentie tegen *V. inaequalis* op appelbladeren (Lecompte *et al.*, 2017). Volgens (Gusberti *et al.*, 2013) zouden suikerconcentraties bij niet geïnoculeerde en oudere bladeren (blad 3) dalen op 4 dpi, wat bevestigd wordt in onze resultaten, terwijl deze van geïnoculeerde planten zouden stijgen, wat we enkel bij fosetyl-AI terugvinden. Verder zien we in Tabel 2 een stijging in relatieve glucose inhoud op 4 dpi ten opzichte van 0 dpi voor water, OG, inulinen en levanen. Deze behandelde bladeren, behalve levanen, bevatten hoge *V. inaequalis* DNA concentraties, waardoor we kunnen stellen dat deze stijgingen een gevolg zijn van verhoogde invertase-activiteiten aan de sinkplaats door zowel plant als pathogeen (Morkunas *et al.* 2010). De lagere hoeveelheid schimmel die kan groeien op fosetyl-AI en levanenbehandelde planten volgens de visuele evaluatie en qPCR analyse, zal ook minder voedingsbronnen consumeren zoals sucrose (Leben & Keitt, 1948). Hierdoor zal ook minder sucrose omgezet worden naar hexosen, waardoor de sucrose concentratie hoog zou moeten blijven. Dit vinden we terug bij levanen met een hogere gemiddelde sucrose concentratie op 14 dpi ten opzichte van deze waarde van water en OG. Sucrose en hexosen kunnen een belangrijke rol spelen in de resistentie tegen pathogene schimmels door stimulatie van het fenylpropanoïd metabolisme (Gibertia *et al.* 2012). De N-INOC groep werd niet geïnoculeerd en bijgevolg kan de pathogeen op deze bladeren sucrose niet omzetten tot hexosen voor eigen consumptie, waardoor een hogere sucrose waarde zou moeten bekomen worden op 14 dpi in vergelijking met de sucrose concentraties van de overige, geïnoculeerde behandelingen, wat niet teruggevonden werd in Fig. 22d. Echter stelde Vaerten (2017) een hogere sucrose concentratie de niet geprimede en niet geïnoculeerde planten vast op 3 dpi in vergelijking met de overige behandelingen. Daarnaast zien we dat het totaal aantal oplosbare suikers gedaald is bij alle behandelingen na 48u onder de incubatieconstructie met een relatieve vochtigheid van 100 %, wellicht door een gereduceerde transpiratiestroom

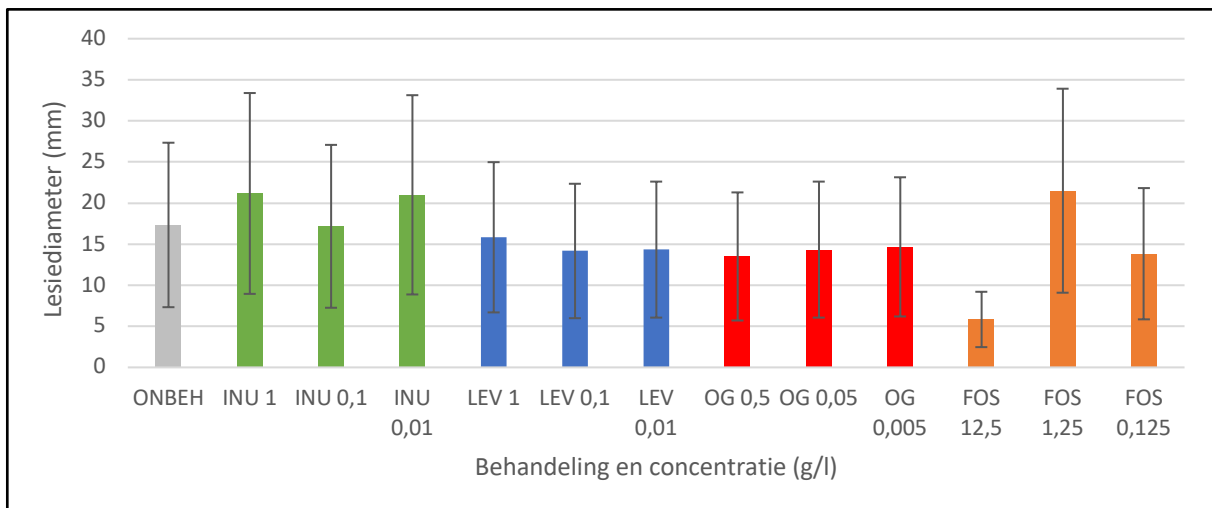
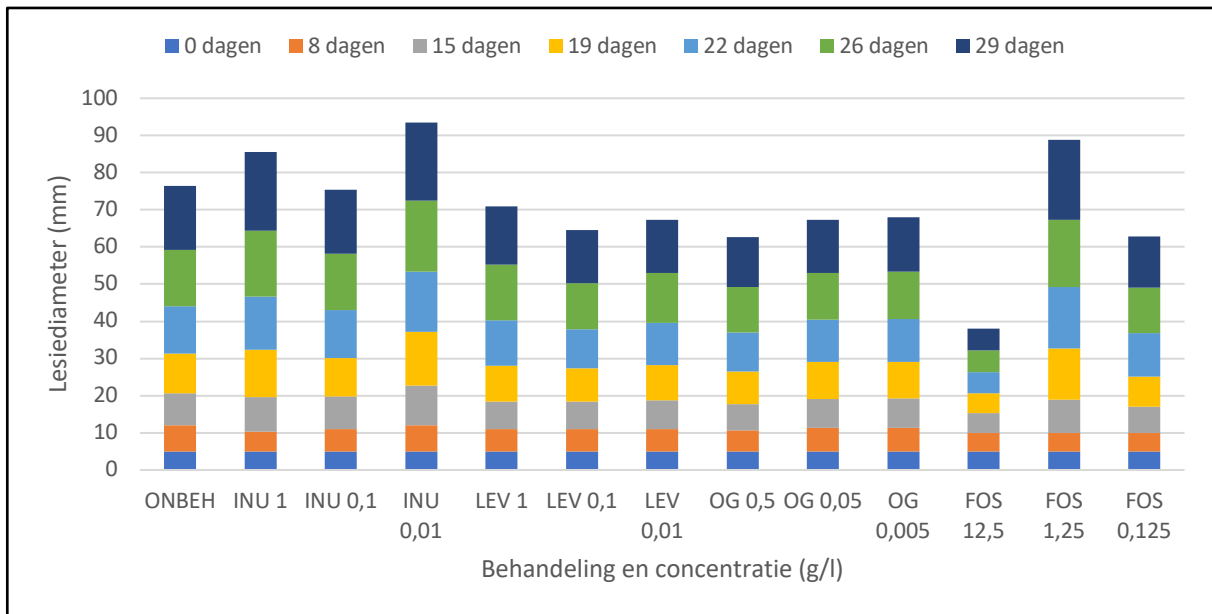
(Jongebloed *et al.*, 2004). Daarnaast kan een te hoge temperatuur, droogtestress en een te hoge windsnelheid ook leiden tot een daling van de transpiratiestroom (Schymanski & Or, 2015). Dit is niet geldig voor onze experimenten, aangezien onze planten onder gecontroleerde condities werden gehouden. Deze daling van het totaal suikergehalte zou ook het gevolg kunnen zijn van de inhibitie van de fotosynthese door sporulatie (Morkunas & Ratajczak, 2014). Een daling in het totaal suikergehalte vinden we dus ook bij de niet geprimede en niet geïnoculeerde planten, wat aantoont dat de plant zelf energie verbruikt voor onderhoud en dus ook voor verdediging. Bovendien kunnen we afleiden uit bijlage 3a dat de gemiddelde chlorose TH waarden stijgen in functie van de tijd voor alle behandelingen, wat wijst op de afbraak van hoogenergetische moleculen waarbij glucose verbruikt wordt (Christ & Hörtensteiner, 2014). Tot slot kunnen de resultaten in dit experiment net als in het eerste experiment beïnvloed zijn door de toevoeging van *T. harzianum* T-22 (Triatum-G) aan de potgrond, waardoor een inductie van ISR kan optreden (Gamir *et al.*, 2014).

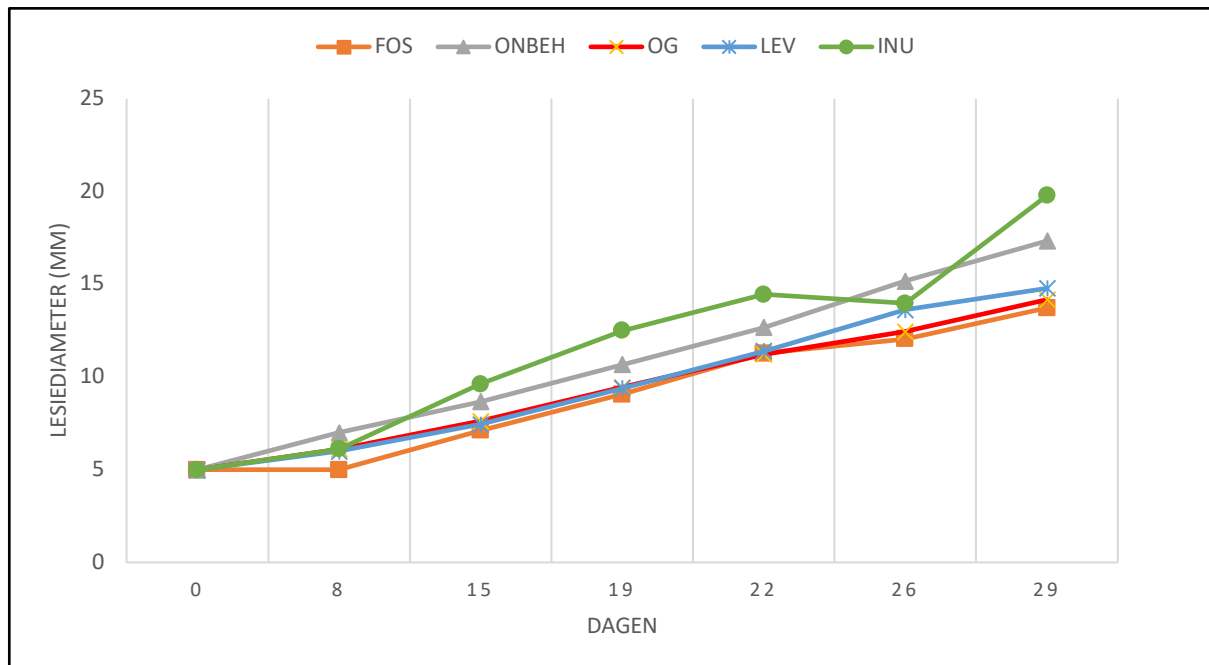
3. Experiment 3: *in vitro* testen

3.1. Groei van de schimmelkolonies

Op regelmatige tijdstippen werd de diameter van de *V. inaequalis* kolonie gemeten per specifieke behandeling. Na een groeiperiode van 29 dagen werd dit *in vitro* experiment beëindigd, omdat er al duidelijke trends waar te nemen waren tussen de verschillende behandelingen. Een toevoeging van fosetyl-Al met een concentratie van 12.5 g/l aan het groeimedium leidt tot een groeistop van de schimmelkolonie (Fig. 23a). Deze behandeling is ook significant verschillend van de onbehandelde media en alle andere behandelingen. Verder lagen de gemiddelde groeicurven van inulinenbehandelingen met een concentratie van 1 en 0.01 g/l in de groeimedia eerder hoger ten opzichte van deze van de controlebehandeling. Dit geldt ook voor de fosetyl-Al behandeling met 1.25 g/l. De gemiddelde lesiediameter van de schimmelkolonie op een medium met inulinen 1 g/l is significant groter dan deze van een onbehandeld medium op dag 29 (Fig. 23b). Een toevoeging van 0.01 g/l levanen aan het groeimedium zorgt voor een significante lagere groei van de schimmelkolonie in vergelijking met deze van het controlemedium. Daarnaast bekomen toevoegingen van OG'n in de groeimedia een gemiddelde lagere groeicurve van de schimmelgroei dan de controlebehandeling. Verschillen in gemiddelde lesiediameter van de schimmel op basis van de concentratie zijn enkel duidelijk te zien bij de fosetyl-Al behandelingen. Indien we geen rekening houden met de drie geteste concentraties, zien we dat fosetyl-Al significant verschilt

van alle andere behandelingen (Fig. 23c). Tot slot leiden groeimedia met inulinen tot geen significante grotere lesiediameter in vergelijking met het onbehandelde medium.





Figuur 23: In vitro testen voor alle behandelingen met specifieke concentratie. a) De gemiddelde gemeten lesiediameters van *V. inaequalis* kolonies opgevolgd in de tijd. Behandelingen zonder gemeenschappelijke letters zijn significant verschillend van elkaar op significantieniveau $\alpha = 0.05$ gedurende het hele experiment. b) De gemiddelde gemeten lesiediameters van *V. inaequalis* kolonies na een groei van 29 dagen. Een asterisk wordt gebruikt om significante verschillen aan te duiden met de onbehandelde behandeling (*: $p < 0.1$; **: $p < 0.05$; Wilcoxon rank sum test, $\alpha = 0.05$; $N = 3$). c) De gemiddelde lesiediameters van *V. inaequalis* kolonies opgevolgd in de tijd waarbij geen rekening werd gehouden met de verschillende concentraties. Behandelingen zonder gemeenschappelijke letters zijn significant verschillend van elkaar op significantieniveau $\alpha = 0.05$. De foutbalken geven het gemiddelde ± 1 standaardfout weer.

3.2. Discussie

Wellicht kan *V. inaequalis* inuline of zijn afbraakproducten gebruiken als voedingsbron, waardoor inulinen een stimulerende werking hebben op de lesiediameter van de kolonie. Volgens Leben & Keitt (1948) zijn glucose, fructose (basismolecule van inuline) en sucrose gunstige voedingsbodems voor de groei van *V. inaequalis*. Daarnaast zorgt een medium met fructose voor meer kieming van *B. cinerea* conidia ten opzichte van een medium met glucose (Blakeman, 1975). Dit kan verklaard worden door een specifiek fructose transport systeem, zo werd recent een specifieke transporter (*FSY1*) met een hoge affiniteit voor fructose ontdekt in gist (Gonçalves *et al.*, 2000). In onze experimenten gaat het om een hemibiotroof, maar het is best mogelijk dat fructose ook hier een belangrijke rol kan spelen. Fosetyl-Al heeft een inhiberende effect op de ontwikkeling van de lesiediameter omwille van een direct fungicide effect. Fosetyl-Al stopt de myceliumgroei en vermindert de productie van sporen (Bayer Cropscience, 2012). Verder zou de significant grotere gemiddelde lesiediameter van fosetyl-Al 1.25 g/l verklaard kunnen worden door een contaminatie of een te lage toevoeging van de specifieke fosetyl-Al oplossing in het groeimedium (Fig. 23b). In de studie van Hussain *et al.*

(2014) toont fosetyl-AI bij verschillende lage concentraties (0.1, 0.2 en 0.3 %) echter een inhiberend effect op de lesiediameters van bijvoorbeeld *Alternaria niger*. Tot slot blijkt *V. inaequalis* geen specifieke transporters of enzymen te bezitten voor opname van levanen en oligogalacturoniden, waardoor een gemiddelde lagere groei bekomen wordt in vergelijking met het controlemedium. Daarnaast kunnen deze componenten mogelijks de opname van glucose, aanwezig in het groeimedium, verstoren door in te grijpen in de verschillende glucose omzettingen. Glucose wordt gefosforyleerd naar glucose-6-fosfaat, vervolgens omgezet naar fructose-6-fosfaat waarna het als pyruvaat opgenomen kan worden door de mitochondria van de schimmel (Hamad *et al.*, 2014).

4. Algemene Discussie

De vergelijking van de resultaten van de drie uitgevoerde experimenten geeft zowel antwoorden als nieuwe vragen in verband met het effect van de exogene toediening van levanen, inulinen en graminanen als fructanen en het effect van endogene suikergehalten in bladeren op de gevoeligheid voor *V. inaequalis*. In het eerste experiment kon de werking van priming in vraag gesteld worden, omwille van de hogere gevoeligheid voor *V. inaequalis* van de bladeren behandeld met de drie fructanen en oligogalacturoniden in vergelijking met deze van de onbehandelde planten. De primingbehandelingen zouden een groei-inhibitie bij de plant veroorzaken door een waterschok effect (Braam & Davis, 1990). We zien dus een combinatie van priming en een waterschok effect. Inulinen leken de meest belovende potentiële primers op basis van de visuele evaluatie, wat echter tegengesproken werd op basis van de qPCR analyse in het eerste experiment. Na het *in vitro* experiment bleken inulinen als voedingsbodem voor *V. inaequalis* te dienen en stimuleerden ze eerder de groei van deze schimmel in plaats van deze te inhiberen. Dit werd ook vastgesteld in Vaerten (2017) en bovendien leidt een medium met fructose tot meer kieming van de conidia van *B. cinerea*, ten opzichte van een medium met glucose, door een specifiek fructose transport systeem (Blakeman, 1975). Inulinen lijken dus niet de sporulatie, maar wel de groei van *V. inaequalis* te stimuleren. Echter zal sporulatie enkel voorkomen wanneer de groeisnelheid van de schimmel vertraagd wordt. Zo zal uithongering of nutritionele uitputting sporulatie stimuleren (Wulandari *et al.* 2009; Braun *et al.* 2011). Verder stellen we op 4 dpi een sterke daling vast van de gemiddelde glucose concentratie in het tweede experiment, wat een grote glucose opname door *V. inaequalis* zou betekenen, aangezien glucose een belangrijke koolstofbron is (Berger *et al.*, 2007). Nochtans zou volgens Arnault *et al.* (2016) een exogene toediening van fructose, het basismolecule van inuline, een primende werking

hebben op appelvruchten tegen de mot *C. pomonella*. Daarentegen vertoonden levanen in het tweede experiment hetzelfde reducerende effect als fosetyl-Al op zowel sporulatiesymptomen als schimmelkwantificatie. Levanen zijn wijdverspreide virulentie factoren bij micro-organismen zoals *E. amylovora* die door PRR's gedetecteerd kunnen worden in appel. Een mogelijke PAMP rol voor levanen werd recent voorgesteld in Versluys *et al.* (2017). Bovendien werd de potentieel primende werking van levanen ook vastgesteld in Vaerten (2017). De resultaten in het tweede experiment laten zien dat levanen de totale suikerinhoud, en meer specifiek de glucosewaarden, doen dalen in de bladeren net vóór de inoculatie en dit kan cruciaal zijn aangezien glucose één van de belangrijkste energiebronnen is voor pathogenen (Berger *et al.*, 2007). Ook zien we op 14 dpi een hogere gemiddelde sucrose concentratie bij levanen, omdat minder Suc omgezet wordt tot hexosen door een lagere schimmelaanwezigheid (Leben & Keitt, 1948). Daarnaast spelen Suc een belangrijke rol in de resistentie tegen pathogene schimmels door stimulatie van het fenylpropanoïd metabolisme (Gibertia *et al.* 2012). Graminanen bleken geen potentiële primende werking te vertonen in het eerste experiment, aangezien de sporulatiegraden en DNA concentraties nog hoger lagen dan deze waarden van de negatieve controle. Wellicht bevat onze kruising van appelzaailingen geen PR receptoren voor gramINANen of afbraakproducten hiervan. Nochtans werd een PAMP rol voorgesteld voor fructanen door Versluys *et al.* (2017). Verder werd uit het eerste en tweede experiment duidelijk dat de DAMP functie van OG niet werkte bij appelzaailingen en deze daarom geen goede, tweede positieve controle vormden. Dit zou verklaard kunnen worden doordat onze kruising van appelzaailingen de WAK receptoren niet bezat om met OG te kunnen binden en hierdoor geen verdedigingsreacties kon induceren (Brutus *et al.*, 2010). Anderzijds moet het ligand groot genoeg zijn of mag er geen te hoge concentratie door de celwand tegengehouden worden (Reymond *et al.*, 1995). Nochtans zou een exogene toediening van OG'n druiven beter beschermen tegen een infectie van *B. cinerea* (Aziz *et al.*, 2004). Vervolgens is de sterkste stijging in relatieve glucose inhoud op 4 dpi ten opzichte van 0 dpi waar te nemen voor bladeren behandeld met OG, waarschijnlijk een gevolg van verhoogde invertase-activiteiten aan de sinkplaats door zowel plant als pathogeen (Morkunas *et al.* 2010).

In de twee inoculatie-experimenten werd de primende werking van fosetyl-Al in appelplanten bevestigd door een hogere expressie van bijvoorbeeld PR proteïnen (Guest *et al.*, 1988; Saindrenan *et al.*, 1988), ook beschreven in Daniels (2013). Bovendien werd eveneens een rechtstreeks fungicide effect op de groei van de lesiediameter van de schimmelkolonie gezien bij het *in vitro* experiment door de myceliumgroei en sporenproductie te beperken (Bayer CropScience, 2012). Het effect van fosetyl-Al op suikerconcentraties uit zich in het

tweede experiment in een sterke daling van de glucose concentratie net vóór de inoculatie, waardoor minder glucose, één van de belangrijkste voedingsbronnen, kan opgenomen worden door de schimmel (Berger *et al.*, 2007). Vervolgens merken we ook een sterke stijging op van de sucrose concentratie op 4 dpi, wat zou leiden tot een verhoogde expressie van *PR* genen (Thibaud *et al.*, 2004) en dus ook betere verdediging tegen *V. inaequalis* creëert. Verder valt het op dat bladeren geprimed met fosetyl-Al op 4 dpi een hoge relatieve fructose-inhoud hebben. Uit onderzoek van Lecompte *et al.* (2017) blijkt een sterke, significante correlatie tussen een hoge relatieve fructose-inhoud en de resistentie voor de necrotrofe pathogeen *B. cinerea* in tomaat. In onze experimenten gaat het om een hemibiotroof, maar het is best mogelijk dat fructose ook hier een belangrijke rol kan spelen. Een behandeling met water op de bladeren kan osmotische stress creëren, waardoor de biosynthese van ABA gestimuleerd wordt, wat een negatieve invloed heeft op het verdedigingssysteem van deze bladeren (Yasuda *et al.*, 2008). Dit kan een verklaring bieden voor de hoge gevoeligheid voor *V. inaequalis* van waterbehandelde appelbladeren in het eerste en tweede experiment. Bij de onbehandelde planten is er geen onderdrukking van het verdedigingshormoon SA, waardoor de sporulatie en schimmelconcentratie lager liggen dan deze van de waterbehandelde planten. Er werd niet bij alle behandelingen een correlatie gevonden tussen sporulatiesymptomen en *V. inaequalis* DNA concentraties, waardoor beide processen mogelijk door verschillende mechanismen gecontroleerd worden. Zo beschreven Osman en Valadon (1979) dat blauw licht (320-450 nm) een verhoogde sporulatie, maar een vertraagde groei van *Verticillium agaricinum* veroorzaakt. Aangezien de laagste DNA concentratie van *V. inaequalis* teruggevonden werd bij de niet geprimede en niet geïnoculeerde planten, wat te verwachten was aangezien er bij deze planten geen inoculatie met schimmelsporen plaatsvond, kunnen we niet veronderstellen dat er iets fout gelopen is tijdens de qPCR analyse. Daarentegen blijft een contaminatie altijd mogelijk in één van de andere stalen door de hoge aanwezigheid van sporen in de omgeving (Dam, 2013). Echter moeten we ook opmerken dat deze qPCR analyse een vertekend beeld kan geven doordat slechts een beperkt stuk (± 20 mg) van het volledige bladoppervlak geanalyseerd werd. Verder moet ook rekening gehouden worden met grote standaardfouten in de resultaten. Uit de resultaten van de visuele evaluaties wordt afgeleid dat hoe jonger het blad, hoe groter de gevoeligheid voor *V. inaequalis* is (Gusberty *et al.*, 2013). Pathogene schimmels vormen de infectieplaatsen om naar sinks, waardoor ze zichzelf kunnen voorzien van nutriënten zoals glucose en fructose (Morkunas & Ratajzak, 2014). Aangezien jonge bladeren van nature reeds sink organen zijn, vormen ze bijgevolg de ideale voedingsbodem voor de groei van de pathogeen bij inoculatie. Naarmate het blad ouder wordt, zien we minder sporulatiesymptomen

omwille van ontogene resistentie (MacHardy, 1996). Ook werd vastgesteld dat de sporulatiegraden van inulinen en OG lager zijn in blad 3 dan deze van de onbehandelde bladeren in het eerste experiment, waardoor inulinen en OG het waterschok effect helpen voorkomen in oudere bladeren. Echter in het tweede experiment kruisen levanen en OG de lijn van de onbehandelde planten op positie 3. Hierdoor kunnen we besluiten dat levanen in het tweede experiment zich gedragen als inulinen in het eerste experiment.

Voor beide inoculatie-experimenten werd een daling van de gemiddelde totale suikerconcentraties vastgesteld in functie van de tijd voor alle behandelingen door een gereduceerde transpiratiestroom die mogelijks veroorzaakt werd door 100 % RH in de inoculatietent (Jongebloed *et al.*, 2004). Daarnaast werden ook lokale dalingen in de fotosynthese activiteit van geïnfecteerde bladeren vastgesteld door (Biemelt and Sonnewald, 2006). Uit combinatie van de suikeranalyses van het eerste en tweede experiment lijken planten waarbij de primingbehandelingen zorgden voor hogere totale suikerwaarden gevoeliger te zijn voor de schimmel *V. inaequalis*. Dit komt niet overeen met de waarnemingen van Morkunas & Ratajczak (2014) waarbij hoge suikergehaltes in het bladweefsel van gele lupine zorgden voor een betere resistentie tegen *F. oxysporum*. Bovendien stelde Engelsdorf *et al.* (2013) dat een laag suikergehalte *Arabidopsis* gevoeliger maakt voor de hemibiotroof *Colletotrichum higginsianum*. Daarnaast toonden mutanten een verhoogde gevoeligheid voor *C. higginsianum* bij een hoog suikergehalte (Engelsdorf *et al.*, 2013). Verder is het moeilijk om de veranderingen in suikerconcentraties te verklaren, aangezien er specifieke interacties optreden in elk plant-pathogeen systeem.

In het tweede experiment lag de sporulatiegraad hoger dan deze in het eerste experiment, wat verklaard kan worden door de jongere, geprimeerde planten in het tweede experiment. Verder kunnen de resultaten in de twee inoculatie-experimenten beïnvloed zijn door de toevoeging van *T. harzianum* T-22 (Triatum-G) aan de potgrond bij de opkweek van de appelzaailingen, waardoor een inductie van ISR kon optreden in de appelbladeren (Gamir *et al.*, 2014). Tot slot kan de cuticula ook een invloed op onze resultaten gehad hebben. Polaire moleculen zoals koolhydraten kunnen het blad binnendringen door transcuticulaire hydrofiele poriën of via de stomatale poriën (Schonherr, 2006). In het geval van sucrose werd slechts 1 % opgenomen via de transcuticulaire poriën en 4 % via de stomata (Eichert and Goldbach, 2008), waardoor een werking van de primingcomponenten in vraag gesteld kan worden.

Conclusies en toekomstperspectieven

Van alle geteste, exogene suikercomponenten blijken levanen de meest belovende ‘sweet primers’ te zijn bij appelzaailingen en kunnen ze mogelijk hand in hand gaan met fungiciden tegen appelschurft. Dit wordt toegeschreven aan een mogelijke PAMP rol, waardoor PR receptoren van appelbladeren levanen herkennen en zo verdedigingsmechanismen kunnen activeren (Versluys *et al.*, 2017). Echter was dit schimmelreducerend effect kleiner in vergelijking met bladeren behandeld met fosetyl-AI (positieve controle). Verder zorgen levanen ook voor een grote daling van het totaal suiker- en glucosegehalte in de bladeren na de priming, waardoor minder glucose, één van de belangrijkste energiebronnen voor pathogenen, opgenomen kan worden. Dit doet ons geloven dat *V. inaequalis* een bepaalde hoeveelheid endogene suikers nodig heeft voor een succesvolle sporulatie en ontwikkeling, en bijgevolg geclassificeerd kan worden als een *high sugar disease*, die meer virulent is op weefsel met hoge suikerconcentraties. Daarentegen lijken inulinen de schimmelgroei eerder te stimuleren, omdat ze vermoedelijk als voedingsbron gebruikt worden door *V. inaequalis* met behulp van een specifiek fructose transport systeem. Verder gedragen levanen in het tweede experiment zich als inulinen in het eerste experiment. Een mogelijke DAMP werking van geprimede bladeren met oligogalacturoniden werd niet bevestigd bij appelzaailingen in onze experimenten. Verder lijken graminanen geen potentiële primers te zijn door een hoge gevoeligheid voor *V. inaequalis*. Ook werd in alle experimenten zowel de primende als de fungicide werking van fosetyl-AI vastgesteld. Het effect van fosetyl-AI op suikerconcentraties uit zich, net zoals bij levanen, in een sterke daling van de glucose concentratie net vóór de inoculatie. Vervolgens wordt op 4 dpi een sterke stijging van de sucrose concentratie en een hoge relatieve fructose-inhoud opgemerkt, wat leidt tot een betere verdediging van de appelbladeren tegen *V. inaequalis*. Ook moeten we rekening houden met een mogelijk waterschok effect, veroorzaakt door de primingbehandeling op zichzelf. In volgend onderzoek moeten experimenten met levanen zeker herhaald worden om de resultaten van deze thesis en een mogelijke PAMP rol te bevestigen. Verder moeten stalen per blad genomen worden, zodat we het effect van bladouderdom op de gevoeligheid voor *V. inaequalis* beter kunnen onderzoeken. In het eerste experiment werd immers met ‘gepoolde’ stalen (blad 1, 2 en 3 samen) gewerkt, waardoor de resultaten moeilijk konden vergeleken worden met deze uit het tweede experiment waarbij stalen per blad genomen werden. Ook een bladstaal van de niet geprimede en niet geïnoculeerde planten op 0 dpi voor suikeranalyse en schimmelkwantificatie moet meegenomen worden in

herhalingsexperimenten, zodat hiermee vergeleken kan worden voor alle behandelingen. Daarnaast is het ook aan te raden controle planten mee te nemen in verdere onderzoeken die niet geïnoculeerd worden om ook hiermee te kunnen vergelijken voor de suikerniveaus. Ook kunnen meer dan 3 bladeren per plant of 3 oudere bladeren geanalyseerd worden in vervolgonderzoek, om zo het effect van priming te testen bij oudere bladeren. Meerdere tijdstippen van staalnamen na inoculatie kan meer informatie geven over de suikerdynamieken die enerzijds door de ('sweet') primingbehandelingen en anderzijds door de fungus zelf veroorzaakt worden. Vervolgens kan het aantal primingbehandelingen verhoogd worden in verder onderzoek om duidelijkere priming effecten te kunnen waarnemen op de appelbladeren. Bovendien kan het tijdstip waarop de primingbehandelingen uitgevoerd werden een rol spelen bij de opname van de componenten door de plant en dus ook op de priming effecten. Het effect van verschillende concentraties van componenten en de duur van de primingwerking kan onderzocht worden in vervolgonderzoek. Ook kan de invloed van een hogere hoeveelheid primingoplossing per plant bekeken worden. Naast priming met individuele suikers kan ook het combinatie-effect van verschillende suikers samen, of suikers gecombineerd met bestrijdingsmiddelen, onderzocht worden. Ook zouden meer herhalingen per behandeling en per staal betrouwbaardere resultaten bieden, wat meer plantmateriaal inhoudt. Verder kan ook onderzocht worden of suikers een systemische werking hebben in de plant. Echter kunnen de primingcomponenten ook een effect hebben op de groei van de plant, wat nagegaan kan worden bij verder onderzoek. Bij het *in vitro* experiment moeten meer replicaten per behandeling gebruikt worden om zo minder variatie in het experiment te verkrijgen. Daarnaast kan ook het rechtstreeks effect van graminanen getest worden op de groei van *V. inaequalis* kolonies. Het waterschok effect moet verder bestudeerd worden. Ondanks het veelbelovende 'sweet immunity' concept, moet de vraag gesteld worden of deze techniek haalbaar is in de praktijk. In de boomgaard zijn er geen constante condities zoals in de serre en verwachten we meer abiotische stress, wat mogelijk het priming effect kan beïnvloeden. Verder zijn er ook nog andere pathogenen, naast *V. inaequalis*, aanwezig in appelbomen, waardoor een exogene toediening of endogene manipulatie van suikers net de groei van andere pathogenen kan stimuleren of ook inhiberen. Tot slot kunnen commercieel belangrijke eigenschappen van appel zoals de smaak mogelijks verstoord worden door wijzigingen in het suikermetabolisme via sweet priming. Zo is de verhouding van suikers op organische zuren een belangrijke parameter die de zoetheid van de appelsmaak bepaalt (Petkovsek *et al.*, 2007).

Referentielijst

- Aderhold, R. 1900. Die Fusicladien unserer Obstbäume. II Teil. *Landwirtsch Jahrb* **29**, p. 541-588.
- Agarwal, P.K. 2007. Climate change: Implications for Indian agriculture. **22**, p. 37–46.
- Andreasson, E. & Ellis, B. 2010. Convergence and specificity in the Arabidopsis MAPK nexus. *Trends in Plant Science* **15**, p. 106–113.
- Annis, S.L. & Goodwin, P.H. 1997. Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology* **103**, p. 1-14.
- Apel, K. & Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**, p. 373–399.
- Aranega-bou, P., De la O Leyva, M., Finiti, I., García-agustín, P. & González-Bosch, C. 2014. Priming of Plant Resistance by Natural Compounds. Hexanoic Acid as a Model. *Frontiers in plant science* **5**, p. 1–12.
- Arnault, I., Ondet, S.J., Lombarkia, N., Warlop, F. & Derridj, S. 2016. Preliminary results of foliar applications of fructose to reduce codling moth *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera, Tortricidae) damages on apple tree in organic farming. *Ecofruit*. 17th International Conference on Organic Fruit-Growing: Proceedings, 15-17 February 2016, Hohenheim, Germany, p. 196-199.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M. & Sheen, J. 2002. MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**, p. 977–983.
- Asai, Y., Kobayashi, Y. & Kobayashi, I. 2016. Increased expression of the tomato SISWEET15 gene during grey mold infection and the possible involvement of the sugar efflux to apoplast in the disease susceptibility. *J Plant Pathol Microbiol* **7**, p. 1– 8.
- Atkinson, N.J. & Urwin, P.E. 2012. The Interaction of Plant Biotic and Abiotic Stresses: From Genes to the Field. *Journal of Experimental Botan* **63**(10), p. 3523–44.
- Ausubel, F.M. 2005. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat. Immunol* **6**, p. 973–79.
- Aziz, A., Heyraud, A. & Lambert, B. 2004. Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta* **218**, p. 767-774.
- Badel, J.L. Charkowski, A.O. Deng, W.-L. & Collmer, A. 2002. A Gene in the *Pseudomonas syringae* pv . tomato Hrp pathogenicity island conserved effector locus , hopPtoA1 , contributes to efficient formation of bacterial colonies in planta and is duplicated elsewhere in the genome. *The American Phytopathological Society* **15**(10), p. 1014–24.
- Barron, G. 2013. *Venturia inaequalis* - cause of Apple Scab. [online afbeelding] Beschikbaar op: https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/bitstream/handle/10214/5908/Venturia_inaequalis_cause_of_Apple_Scab.jpg?sequence=1&isAllowed=y [datum van opzoeking: 16/11/2017].
- Baydoun, E. A. H. & Fry, S. C. 1985. The immobility of pectic substances in injured tomato leaves and its bearing on the identity of the wound hormone. *Planta* **165**, p. 269–276.
- Bayer CropScience. 2012. Product Information sheet Aliette®. [online] Beschikbaar op: www.bayercropscience.be/Bayer/CropScience/BCS_Belgium.nsf/id/NL_ALietteWG [datum van opzoeking: 4/4/2018].
- Beckers, G.J., Jaskiewicz, M., Liu, Y., Underwood, W.R., He, S.Y., Zhang, S., & Conrath,

- U. 2009. Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **21**, p. 944–953.
- Belete, T., & Boyraz, N. 2017. Critical Review on Apple Scab (*Venturia inaequalis*) Biology , Epidemiology , Economic Importance , Management and Defense Mechanisms to the Causal Agent. *Journal of Plant Physiology & Pathology* **5**, p. 1-11.
- Belfanti, E., Silfverberg-Dilworth, E., Tartarini, S., Patocchi, A., Barbieri, M., Zhu, J., Vinatzer, B.A., Gianfranceschi, L., Gessler, C., & Sansavini, S. 2004. The HcrVf2 gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(3), p. 886–890.
- Bellin, D., Shuta, A., Delledonne, M., & Yoshioka, H. 2013. Nitric Oxide as a Mediator for Defense Responses **26**(3), p. 271–77.
- Berger, S., Sinha, A.K., & Roitsch, T. 2007. Plant Physiology Meets Phytopathology : Plant Primary Metabolism and Plant – Pathogen Interactions **58**(15), p. 4019–26.
- Biemelt, S. & Sonnewald, U. 2006. Plant-microbe interactions to probe regulation of plant carbon metabolism. *J Plant Physiol* **163**, p. 307–318.
- Billiard, S., Lopez-Villaviciencio, M., Devier, B., Hood, M.E., Fairhead, C., & Giraud, T. 2011. Having sex, yes, but with whom? Inferences from fungi on the evolution of anisogamy and mating types. *Biological Reviews* **86**, p. 421–442.
- Blakeman, J.P., 1975. Germination of *Botrytis cinerea* conidia *in vitro* in relation to nutrient conditions on leaf surfaces. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **65**, p. 239–247.
- Böhm, H., Albert, I., Fan, L., Reinhard, A., & Nürnberger, T. 2014. Immune receptor complexes at the plant cell surface. *Current Opinion in Plant Biology* **20**, p. 47-54.
- Bolouri-Moghaddam, M.R., & van den Ende, W. 2012. Sugars and plant innate immunity. *Journal of Experimental Botany* **63**, p. 3989–3998.
- Bolouri-Moghaddam, M.R., Le Roy, K., Xiang, L., Rolland, F., & van den Ende, W. 2010. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *FEBS Journal* **277**, p. 2022–2037.
- Bolouri-Moghaddam, M.R., & van den Ende, W. 2013a. Sweet immunity in the plant circadian regulatory network. *J. Exp. Bot.* **64**, p. 1439–1449.
- Bolouri-Moghaddam, M.R., Vilcinskas, A., & Rahnamaeian, M. 2015. Cooperative interaction of antimicrobial peptides with the interrelated immune pathways in plants. *Molecular Plant Pathology*.
- Bolton, M.D. 2009. Primary metabolism and plant defense-fuel for the fire. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, p. 487–497.
- Boone, D.M. 1971. Genetics of *Venturia inaequalis*. *Annual Review of Phytopathology* **9**, p. 297–318.
- Both, M., Csukai, M., Stumpf, M.P.H., & Spanu, P.D. 2005. Gene expression profiles of *Blumeria graminis* indicate dynamic changes to primary metabolism during development of an obligate biotrophic pathogen. *The Plant Cell* **17**(7), p. 2107-2122.
- Boudsocq, M., Willmann, M.R., McCormack, M., Lee, H., Shan, L., He, P., Bush, J., Cheng, S.-H., & Sheen, J. 2010. *Nature* **464**(7287), p. 418–22.
- Bowen, J.A., Mesarich, C.H., Bus, V.G.M., Beresford, R.M., Plummer, K.M., & Templeton, M.D. 2011. *Venturia inaequalis*: the causal agent of apple scab. *Molecular Plant Pathology* **12**, p. 105–122.
- Bowles, D.J. 1990. Defense-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem* **59**, p. 873–907.
- Braam, J. & Davis, R.W. 1990. Rain-, Wind-, and Touch-Induced Expression of Calmodulin and Calmodulin-Related Genes in *Arabidopsis*. *Cell* **60**, p. 357-364.

- Braun, U., Crous, P.W., Groenewald, J.Z. & Scheuer, C. 2011. Pseudovirgaria, a fungicolous hyphomycete genus. *IMA Fungus* **2**(1), p. 65–69.
- Braybrook, S.A., & Peaucelle, A. 2013. Mechano-chemical aspects of organ formation in *Arabidopsis thaliana*: the relationship between auxin and pectin. *PloS one* **8**(3).
- Brutus, A., Sicilia, F., Macone, A., Cervone, F., & De Lorenzo, G. 2010. A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proc. Natl. Acad. Science U.S.A.* **107**, p. 9452–9457.
- Bus, V.G.M., Rikkerink, E.H.A., Caffier, V., Durel, C.-E., & Plummer, K.M. 2011. Revision of the nomenclature of the differential host-pathogen interactions of *Venturia inaequalis* and *Malus*. *Annual Review of Phytopathology* **49**, p. 391-413.
- Bus, V.G.M., Rikkerink, E.H.A., van de Weg, W.E., Rusholme, R.L., Gardiner, S.E., Bassett, H.C.M., Kodde, L.P., Parisi, L., Laurens, F.N.D., Meulenbroek, E.J., & Plummer, K.M. 2005a. The Vh2 and Vh4 scab resistance genes in two differential hosts derived from Russian apple R12740-7A map to the same linkage group of apple. *Molecular Breeding* **15**, p. 103-116.
- Bush, D.S. 1995. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, p. 95–122.
- Cameron, R.K., *et al.* 1999. Accumulation of salicylic acid and PR-1 gene transcripts in relation to the systemic acquired resistance (SAR) response induced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato in *Arabidopsis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **55**, p. 121–130.
- Cammue, B. 2016-2017. 02 Ziekte-ontwikkeling: algemeen. *Levenswijzen van pathogenen*. Dia 3.
- Cammue, B. 2016-2017. 07 Afweermecanismen van planten. *Vorming van thyllen*. Dia 21.
- Cammue, B. 2016-2017. 08 Genetica. *Genetische basis van gastheer-resistentie*. Dia 6.
- Cammue, B. 2016-2017. 08 Genetica. *Resistentie versus tolerantie*. Dia 2.
- Cánovas, F., Lüttge, U., & Matyssek, R. 2017. *Progress in Botany* **78**, p.14.
- Cao, H., *et al.* 1998. Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc. Natl. Acad. Science U.S.A.* **95**, p. 6531–6536.
- Carisse, O., & Jobin, T. 2006. Apple Scab: Improving Understanding for Better Management. Agriculture and Agri-Food, Canada, p.1-22.
- Caverzan, A., Casassola, A., & Brammer, S.P. 2016. Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives. *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Enzymes Involved in Plant Tolerance to Stress* **20**, p.463–480.
- Ceusters, J., Borland, A.M., & De Proft, M.P. 2009a. Drought adaptation in plants with crassulacean acid metabolism involves the flexible use of different storage carbohydrate pools. *Plant Signal Behav.* **4**, p. 212–214.
- Ceusters, J., Borland, A.M., Londers, E., Verdoodt, V., Godts, C., & De Proft, M.P. 2009b. Differential usage of storage carbohydrates in the CAM bromeliad *Aechmea* ‘Maya’ during acclimation to drought and recovery from dehydration. *Physiol. Plant* **135**, p. 174–184.
- Chen, H.Y., Huh, J.H., Yu, Y.C., Ho, L.H., Chen, L.Q., Tholl, D., Frommer, W., & Guo, W.J. 2015. The *Arabidopsis* vacuolar sugar transporter SWEET2 limits carbon sequestration from roots and restricts *Pythium* infection. *The Plant Journal* **83**(6), p. 1046-1058.
- Cheng, C., Gao, X., Feng, B., Sheen, J., Shan, L., & He, P. 2013. Plant immune response to pathogens differs with changing temperatures. *Nature Communications* **4**, p. 1–9.
- Chern, M., Fitzgerald, H.A., Canlas, P.E., Navarre, D.A., & Ronald, P.C. 2005. Overexpression of a rice NPR1 homolog leads to constitutive activation of defence response and hypersensitivity to light. *Mol. Plant Microbe Interact* **18**, p. 511–520.

- Chevalier, M., Lespinasse, Y., & Renaudin, S. 1991. A microscopic study of the different classes of symptoms coded by the Vf gene in apple for resistance to scab (*Venturia inaequalis*). *Plant Pathology* **40**, p. 249–256.
- Chevreau, E., Dupuis, F., Ortolan, C. *et al.* 2001. Transformation of apple for durable scab resistance, expression of a puroindoline gene in a susceptible and resistant (Vf) genotype. *Acta Horti- culturae* **560**, p. 323–326.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nurnberger, T., Jones, J.D.G., Felix, G., & Boller, T. 2007. A flagellin- induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**, p. 497–500.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B.J. 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**, p. 803–814.
- Cho, Y.-H., & Yoo, S-D. 2011. Signaling Role of Fructose Mediated by FINS1 / FBP in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* **7**(1), p. 1–10.
- Christ, B. & Hörtensteiner, S. 2014. Mechanism and Significance of Chlorophyll Breakdown. *J Plant Growth Regul* (November 2013), p. 1–17.
- Claeyssen, É., & J. Rivoal 2007. Isozymes of plant hexokinase: Occurrence, properties and functions. *Phytochemistry* **68**(6), p. 709-731.
- Cohen, Y.R. 2002. β -Aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens. *PlantDis* **86**, p. 448–57.
- Conrath, U. 2009. Priming of induced plant defence responses. In: Van Loon, L.C. (Editor), *Advances in Botanical Research*, Elsevier, p. 361–395.
- Conrath, U. 2009. Priming of induced plant defense responses. *Advances in Botanical Research* **51**, p. 361-395.
- Conrath, U. 2011. Molecular aspects of defence priming. *Trends Plant Science* **16**, p. 524–531.
- Conrath, U., Pieterse, C.M.J., & Mauch-Mani, B. 2002. Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Science* **7**, p. 210–216.
- Conrath, U., Beckers, G.J., Flors, V., Garcia-Agustin, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M.A., Pieterse, C.M., Poinssot, B., Pozo, M.J., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L., & Mauch-Mani, B. 2006. Priming: getting ready for battle. *Mol. Plant Microbe Interact* **19**, p. 1062–1071.
- Conrath, U., Beckers, G.J.M., Langenbach, C.J.G., & Jaskiewicz, M.R. 2015. Priming for enhanced defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* **53**, p. 97–119.
- Cook, D.E., Mesarich, C.H., & Thomma, B.P. 2015. Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion. *Annu. Rev. Phytopathol.* **53**, p. 541–563.
- Cote, F., Ham, K.S., Hahn, M.G. & Bergmann, C.W. 1998. Oligosaccharide elicitors in host-pathogen interactions. Generation, perception, and signal transduction. *Subcell Biochem* **29**, p. 385-432.
- Couée, I., Sulmon, C., Gouesbet, G., & El Amrani, A. 2006. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **57**, p. 449–459.
- Dam, N. 2013. Spores do travel. *Mycologia* **105**, p. 1618-1622.
- Dangl, J.L., & Jones, J.D.G. 2001. Plant pathogens and integrated defense responses. *Nature* **411**, p. 826–833.
- Daniels, B. 2013. Response of apple (*Malus X Domestica*) to *Venturia Inaequalis*, the causal agent of apple scab: a real-time PCR and proteomics study. p. 1-199.
- Darvill, A., Augur, C., Bergmann, C., Carlson, R. W., Cheong, J.-J., Eberhard, S., Hahn, M. G., Lo, V.-M., Marfa, V., Meyer, B., Mohnen, D., O'Neill, M.A., Spiro, M. D., van Halbeek, H., Work, W. S. & Albersheim, P. 1992. *Glycobiology* **2**, p. 181-198.
- Davis, K.R., Darvill, A.G., Albersheim, P., & Dell, A. 1986. Host pathogen interactions

- XXIX. Oligogalacturonides released from sodium polypectate by endopolygalacturonic acid lyase are elicitors of phytoalexins in soybean. *Plant Physiology* **80**, p. 568-577.
- De Coninck, B., Le Roy, K., Francis, I., Clerens, S., Vergauwen, R., Halliday, A.M., Smith, S.M., Van Laere, A. & van den Ende, W. 2005. Arabidopsis AtcwINV3 and 6 are not invertases but are fructan exohydrolases (FEHs) with different substrate specificities. *Plant, Cell & Environment* **28**, p. 432-443.
- Demel, R.A., Dorrepaal, E., Ebskamp, M.J.M., Smeekens, J.C.M., & de Kruijff, B. 1998. Fructans interact strongly with model membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1375**, p. 36-42.
- Demidchik, V. 2015. Mechanisms of Oxidative Stress in Plants: From Classical Chemistry to Cell Biology. *Environmental and Experimental Botany* **109**, p. 212-28.
- Demidchik, V., & Maathuis, F.J.M., 2007. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *Transl. Rev. New Phytol.* **175**, p. 387-405.
- Denoux, C., Galletti, R., Mammarella, N., Gopalan, S., Werck, D., De Lorenzo, G., Ferrari, S., Ausubel, F.M., & Dewdney, J. 2008. Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in Arabidopsis seedlings. *Molecular Plant* **1**(3), p. 423-445.
- Doehlemann, G., Wahl, R., Horst, R.J., Voll, L.M., Usadel, B., Poree, F., Stitt, M., Pons-Kühnemann, J., Sonnewald, U., Kahmann, R. & Kämper, J. 2008. Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *Plant J* **56**, p. 181-195.
- Dong, X. 2004. NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, p. 547-552.
- Duran-Flores, D., & Heil, M. 2016. Sources of specificity in plant damaged-self recognition. *Curr. Opin. Plant Biol.* **32**, p. 77-87.
- Engelsdorf, T., Horst, R. J., Pröls, R., Pröschel, M., Dietz, F., Hückelhoven, R. & Voll, L. M. 2013. Reduced carbohydrate availability enhances the susceptibility of Arabidopsis toward *Colletotrichum higginsianum*. *Plant physiology* **162**(1), p. 225-238.
- Eichert, T., Kurtz, A., Steiner, U. & Goldbach, H. E. 2008. Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. *Physiol. Plant.* **134**, p. 151-160.
- Espinosa, N.A., Saze, H., & Saijo, H. 2016. Epigenetic Control of Defense *Signaling and Priming in Plants* **7**, p. 1-7.
- Essmann, J., Schmitz-Thom, I., Schon, H., Sonnewald, S., Weis, E., & Scharte, J. 2008. RNA interference-mediated repression of cell wall invertase impairs defence in source leaves of tobacco. *Plant Physiology* **147**, p. 1288-1299.
- Eulgem, T. 2005. Regulation of the Arabidopsis defence transcriptome. *Trends Plant Science* **10**, p. 71-78.
- Eyidogan, F., Oz, M.T., Yucel, M., & Oktem, H.A. 2012. Signal transduction of phytohormones under abiotic stresses. *Khan et al. (Editors), Phytohormones and Abiotic Stress Tolerance in Plants*. Springer-Verlag Heidelberg, Berlin, 2012.
- FAO, 2013. FAO SPECIFICATIONS AND EVALUATIONS FOR AGRICULTURAL PESTICIDES. FOSETYL-ALUMINIUM. p. 1-36.
- Farooq, M., Hussain, M., Wahid, A., & Siddique, K.H.M. 2012. Plant Responses to Drought Stress: Chapter 1: Drought Stress in Plants : An Overview. *Plant Responses to Drought Stress*, p. 1-6.
- Ferrari, S., Galletti, R., Denoux, C., De Lorenzo, G., Ausubel, F.M., & Dewdney, J. 2007. Resistance to *Botrytis cinerea* induced in Arabidopsis by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. *Plant Physiology* **144**, p. 367-379.

- Ferrari, S., Savatin, D.V., Sicilia, F., Gramegna, G., Cervone, F., & De Lorenzo, G. 2013. Oligogalacturonides: Plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Frontiers in Plant Science* **4**(49), p. 1-9.
- Fu, Z.Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., Mohan, R., Spoel, S.H., Tada, Y., Zheng, N., & Dong, X. 2014. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* **486**(7402), p. 228–232.
- Gau, A.E., Koutb, M., Piotrowski, M., & Klopp- stech, K. 2004. Accumulation of pathogenesis-related proteins in the apoplast of a susceptible cultivar of apple (*Malus domestica* cv. Elstar) after infection by *Venturia inaequalis* and constitutive expression of PR genes in the resistant cultivar Remo. *European Journal of Plant Pathology* **110**(7), p. 703– 711.
- Gebauer, P., Korn, M., Engelsdorf, T., Sonnewald, U., Koch, C. & Voll, L.M. 2017. Sugar accumulation in leaves of *Arabidopsis* sweet11/sweet12 double mutants enhances priming of the salicylic acid-mediated defense response. *Front. Plant Sci.*, **8**.
- Gibertia S., Berteab, C.M., Narayanab, R., Maffeib, M.E. & Forlani, G. 2012. Two phenylalanine ammonia lyase isoforms are involved in the elicitor-induced response of rice to the fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *J Plant Physiol* **169**, p.249–254.
- Gibson, S.I. 2005. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, p. 93-102.
- Gimenez, E., Salinas, M. & Manzano-agugliaro, F. 2018. Worldwide Research on Plant Defense against Biotic Stresses as Improvement for Sustainable Agriculture. *Sustainability* **10**, p. 1–19.
- Gisi, U., Sierotzki, H., Cook, A., & McCaffery, A. 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science* **58**, p. 859-867.
- Goellner, K. & Conrath, U. 2008. Priming: it's all the world to induced disease resistance. *Eur J Plant Pathol* **121**, p.233–242.
- Gomez-Ariza, J., Campo, S., Rufat, M., Estopa, M., Messeguer, J., San Segundo, B., *et al.* 2007. Sucrose-mediated priming of plant defense responses and broad- spectrum disease resistance by overexpression of the maize pathogenesis-related PRms protein in rice plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* **20**, p. 832–842.
- Gonçalves, P., Rodrigues, D.E., Sousa, H. & Spencer-Martins, I., 2000. FSY1, a novel gene encoding a specific fructose/H⁺ symporter in the type strain of *Saccharomyces carlsbergensis*. *J. Bacteriol.* **182**, p. 5628–5630.
- Granot, D., David-Schwartz, R., & Kelly, G. 2013. Hexose kinases and their role in sugar-sensing and plant development. *Frontiers in Plant Science* **4**(44), p. 1-17.
- Guest, D.I. 1984. Modification of defense responses in tobacco and capsicum following treatment with Fosetyl-Al [Aluminium tris (o-ethyl phosphonate)]. *Physiological Plant Pathology* **25**(2), p. 125-134.
- Guest, D.I., Saindrenan, P., Barchietto, T., & Bompeix, G. 1988. *The phosphonates, anti-oomycete chemicals with a complex mode of action. Proceedings of the 5th International congress on Plant Pathology, Kyoto*, p. 333.
- Gusberti, M., Gessler, C. & Broggini, G. A. L. 2013. RNA-Seq Analysis Reveals Candidate Genes for Ontogenic Resistance in *Malus-Venturia* Pathosystem. *Plos* **8**, p. 1-14.
- Hamad, H. O., Alma, M. H., Ismael, H. M. & Ali, Goceri, A. 2014. The Effect of Some Sugars on the Growth of *Aspergillus Niger*. *KSU J. Nat. Sci* **17**(4), p. 7–11.
- Harborne, J.B., & Williams, C.A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, p. 481–504.
- Hayes, M.A., Feechan, A., & Dry, I.B. 2010. Involvement of abscisic acid in the coordinated regulation of a stress-inducible hexose transporter (VvHT5) and a cell wall invertase in

- grapevine in response to biotrophic fungal infection. *Plant Physiology* **153**, p. 211–221.
- Hayward, A.P., Tsao, J., & Dinesh-Kumar, S.P. 2009. Autophagy and plant innate immunity: defense through degradation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, p. 1041–1047.
- He, Z.H., He, D.Z., & Kohorn, B.D. 1998. Requirement for the induced expression of a cell wall associated receptor kinase for survival during the pathogen response. *Plant Journal* **14**, p. 55–63.
- Hendry, G.A.F., 1993. Evolutionary origins and natural functions of fructans: taxonomic, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist* **123**, p. 3–14.
- Hernandez-Marin, E., & Martínez, A. 2012. Carbohydrates and their free radical scavenging capability: a theoretical study. *The Journal of Physical Chemistry* **116**, p. 9668–9675.
- Hey, S.J., Byrne, E., Halford, N.G. 2010. The interface between metabolic and stress signaling. *Ann Bot* **105**, p.197–203.
- Hilker, M., *et al.* 2015. Priming and memory of stress responses in organisms lacking a nervous system. *Biol. Rev.*
- Hincha, D.K., Zuther, E., & Heyer, A.G. 2003. The preservation of liposomes by raffinose family oligosaccharides during drying is mediated by effects on fusion and lipid phase transitions. *Biochim. Biophys. Acta* **1612**, p. 172–177.
- Hincha, D.K., Zuther, E., Hellwege, E.M., & Heyer, A.G. 2002. Specific effects of fructo- and gluco- oligosaccharides in the preservation of liposomes during drying. *Glycobiology* **12**, p. 103–110.
- Horsfall, J.G., & Dimond, A.E. 1957. Interactions of tissue sugar, growth substances and disease susceptibility. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschulz* **64**, p. 415-421.
- Hrazdina, G., Borejsza-Wysocki, W. & Lester, C. 1997. Phytoalexin production in an apple cultivar resistant to *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **87**(8), p. 868–876.
- Hussain, F., Shaikat, S. S., Abid, M., Usman, F. & Akbar, M. 2014. The Effects of Fungicides Alone and in Conjunction with Chitin on the Control of Some Fungal Pathogens Associated with Chilli Seeds. *World Applied Sciences Journal* **32**(5), p. 977–85.
- Hyun, T.K., Hoffmann, A., Sinha, A.K., & Roitsch, T. 2009. Tomato mitogen activated protein kinases regulate the expression of extracellular invertase Lin6 in response to stress related stimuli. *Functional Plant Biology* **36**, p. 1088–1097.
- Ichimura, K., Casais, C., Peck, S.C., Shinozaki, K., & Shirasu, K. 2006. MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **281**, p. 36969–36976.
- IPCC. 2014. *Klimaatverandering 2014: Gevolgen, Aanpassing en Kwetsbaarheid. Evaluatierapport van het IPCC* **5**, p. 1–6.
- Ishihama, N., & Yoshioka, H. 2012. Post-Translational Regulation of WRKY Transcription Factors in Plant Immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **15**, p. 431–437.
- Jacobson, E. S. 2000. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clinical Microbiology Reviews* **13**(4), p. 708–717.
- Janda, M., & Ruelland, E. 2015. Magical mystery tour: Salicylic acid signaling. *Environmental and Experimental Botany* **114**, p. 117-128.
- Jaskiewicz, M., Conrath, U., & Peterhänsel, C. 2011. Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. *EMBO Reports* **12**(1), p. 50-55.
- Jha, G., Thakur, K., & Thakur, P. 2009. The *Venturia* Apple Pathosystem: Pathogenicity Mechanisms and Plant Defense Responses. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2009**, p. 1-10.
- Jones, J.D.G., & Dangl, J.L. 2006. The Plant Immune System. *Nature* **444**, p. 323–329.

- Jones, P., & Vogt, T. 2001. Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* **213**, p. 164-174.
- Jung, H.W., Tschaplinski, T.J., Wang, L., Glazebrook, J., & Greenberg, J.T. 2009. Priming in systemic plant immunity. *Science* **324**, p. 89–91.
- Kang, Y., Khan, S., & Ma, X. 2009. Climate change impacts on crop yield, crop water productivity and food security – A review. *Progress in Natural Science* **19**(12), p.1665–1674.
- Kawano, Y., & Shimamoto, K. 2013. Early signaling network in rice PRR-mediated and R-mediated immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **16**, p. 496-504.
- Kempel, A., Schädler, M., Chrobock, T., Fischer, M., & van Kleunen, M. 2011. Tradeoffs Associated with Constitutive and Induced Plant Resistance against Herbivory. *PNAS* **108**(14), p.5685–89.
- Keyse, S.M. 2000. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, p. 186–192.
- Knogge, W. 1996. Fungal Infection of Plants. **8**, p. 1711–22.
- Koch, K. 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, p. 235–246.
- Koch, K.E. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu.Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, p. 509–540.
- Koczan, J. M., Mcgrath, M. J., Zhao, Y. & Sundin, G. W. 2009. Contribution of *Erwinia Amylovora* Exopolysaccharides Amylovoran and Levan to Biofilm Formation: Implications in Pathogenicity. *The American Phytopathological Society* **99**(11), p. 1237–44.
- Kohorn, B.D., & Kohorn, S.L. 2012. The cell wall-associated kinases, WAKs, as pectin receptors. *Frontiers in Plant Science* **3**(88), p. 1-5.
- Kohorn, B.D., Kohorn, S.L., Todorova, T., Baptiste, G., Stansky, K., & McCullough, M. 2011. A dominant allele of *Arabidopsis* pectin-binding wall-associated kinase induces a stress response suppressed by MPK6 but not MPK3 mutations. *Molecular Plant*.
- Kombrink, A., Sánchez-Vallet, A., & Thomma, B.P.H.J. 2011. The role of chitin detection in plant-pathogen interactions. *Microbes and Infection* **13**, p. 1168-1176.
- Komjanc, M., Festi, S., Rizzotti, L., Cattivelli, L., Cervone, F., & De Lorenzo, G. 1999. A leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRPKm1) gene is induced in *Malus x domestica* by *Venturia inaequalis* infection and salicylic acid treatment. *PlantMolecular Biology* **40**(6), p. 945–957.
- Kunz, S., Gardeström, P., Pesquet, E., & Kleczkowski, L.A. 2015. Hexokinase 1 is required for glucose-induced repression of bZIP63, At5g22920, and BT2 in *Arabidopsis*. *Front Plant Science* **6**, p. 525.
- Lamb, C., & Dixon, R.A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, p. 251–275.
- Landgraf, R., Schaarschmidt, S., & Hause, B. 2012. Repeated Leaf Wounding Alters the Colonization of *Medicago Truncatula* Roots by Beneficial and pathogenic microorganisms. *Plant, Cell and Environment* **35**, p. 1344–57.
- Lastdrager, J., Hanson, J., & Smeekens, J. 2014. Sugar Signals and the Control of Plant Growth and Development. *Journal of Experimental Botany* **65**(3), p. 799–807.
- Leben, C., & Keitt, G.W. 1948. *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. V. The influence of carbon and nitrogen sources and vitamins on growth *in vitro*. *American journal of botany*, p. 337-343.
- Lecompte, F., Nicot, P.C., Ripoll, J., Abro, M.A., Raimbault, A.K., Lopez-Lauri, F., & Bertin, N. 2017. Reduced susceptibility of tomato stem to the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* is associated with a specific adjustment of fructose content in the host sugar

- pool. *Annals of Botany*.
- Lee, K.W., Kim, Y.J., Kim, D.O., Lee, H.J., & Lee, C.Y. 2003. Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *Journal of agricultural and food chemistry* **51**(22), p. 6516-6520.
- Leon, J., Lawton, M.A., & Raskin, L. 1995. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology* **108**, p. 1673–1678.
- Li, W.L., Faris, J.D., Muthukrishnan, S., Liu, D.J., Chen, P.D., & Gill, B.S. 2001. Isolation and Characterization of Novel cDNA Clones of Acidic Chitinases and β -1, 3-Glucanases from Wheat Spikes Infected by *Fusarium Graminearum*. *Theor Appl Genet* **102**, p. 353–62.
- Longhi, S., & Cambillau, C. 1999. Structure-Activity of Cutinase, a Small Lipolytic Enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta* **1441**, p. 185-196.
- van Loon, L., Rep, M., & Pieterse, C. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**, p. 135-162.
- Low, P.S. & Merida, J.R. 1996. The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. *Physiol Plant* **96**, p.533-542.
- MacHardy, W. E. 1996. *Apple Scab, Biology, Epidemiology, and Management*, APS. St. Paul, Minn, USA.
- Macho, A.P., & Zipfel, C. 2014. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Molecular Cell* **54**, p. 263-272.
- Mahajan, S., & Tuteja, N. 2005. Cold, Salinity and Drought Stresses: An Overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **444**, p. 139–58.
- Maldonado, A.M., Doerner, P., Dixon, R.A., Lamb, C.J., & Cameron, R.K. 2002. A putative lipid transfer protein involved in systemic acquired resistance signalling in Arabidopsis. *Nature* **419**, p. 399–403.
- MAPK-Group. 2002. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Sciences* **7**, p. 301–308.
- Marínez-Noël, G.M.A., Tognetti, J.A., Salerno, G.L., Wiemken, A., & Pontis, H.G. 2009. Protein phosphatase activity and sucrose-mediated induction of fructan synthesis in wheat. *Planta* **230**, p. 1071–1079.
- Meng, X., Xu, J., He, Y., Yang, K.-Y., Mordorski, B., Liu, Y., & Zhang, S. 2013. Phosphorylation of an ERF Transcription Factor by Arabidopsis MPK3 / MPK6 Regulates Plant Defense Gene Induction and Fungal Resistance. *The Plant Cell* **25**, p. 1126–42.
- Meskiene, I., Baudouin, E., Schweighofer, A., Liwosz, A., Jonak, C., Rodriguez, P.L., Jelinek, H., & Hirt, H. 2003. The stress-induced protein phosphatase 2C is a negative regulator of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **278**, p. 18945–18952.
- Mills, W.D., & LaPlante, A.A. 1954. *Apple scab*. In: *Disease and insects in the orchard*, Cornell Extension Bulletin **711**, p. 20–28.
- Mishina, T.E., & Zeier, J. 2007. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. *Plant J.* **50**, p. 500–513.
- Mittler, R. 2002. Oxidative Stress, Antioxidants and stress tolerance. *TRENDS in Plant Science* **7**(9), p. 405–10.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H. & Shibuya, N. (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, p. 19613–19618.
- Molinier, J., Ries, G., Zipfel, C., & Hohn, B. 2006. Transgeneration memory of stress in plants. *Nature* **442**, p. 1046–1049.

- Monaghan, J., & Zipfel, C. 2012. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current Opinion in Plant Biology* **15**, p. 349-357.
- Moreau, M., Tian, M., & Klessig, D.F. 2012. Salicylic Acid Binds NPR3 and NPR4 to Regulate NPR1-Dependent Defense Responses. *Cell Research* **22**, p. 1631–33.
- Morkunas, I., & Ratajczak, L. 2014. The Role of Sugar Signaling in Plant Defense Responses against Fungal Pathogens. *Acta Physiol Plant* **36**, p. 1607–19.
- Morkunas, I., Marczak, Q., Stachowiak, J., & Stobiecki, M. 2005. Sucrose-stimulated accumulation of isoflavonoids as a defence response of lupine to *Fusarium oxysporum*. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**, p. 363–73.
- Morkunas, I., Stobiecki, M., Marczak, Ł., Stachowiak, J., Narozna, D., & Remlein-Starosta, D. 2010. Changes in carbohydrate and isoflavonoid metabolism in yellow lupine in response to infection by *Fusarium oxysporum* during the stages of seed germination and early seedling growth. *Physiol Mol Plant Pathol* **75**, p. 46–55.
- Mou, Z., Fan, W., & Dong, X. 2003. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**, p. 935-944.
- Muthamilarasan, M., & Prasad, M. 2013. Review Plant Innate Immunity: An Updated Insight into Defense Mechanism. *J. Biosci* **38**, p. 433–449.
- Nägele, T., & Heyer, A.G. 2013. Approximating subcellular organization of carbohydrate metabolism during cold acclimation in different natural accessions of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* **198**, p. 777–787.
- Nakagami, H., Kiegerl, S., & Hirt, H. 2004. OMTK1, a novel MAPKKK, channels oxidative stress signaling through direct MAPK interaction. *Journal of Biological Chemistry* **279**, p. 26959–26966.
- Nakagami, H., Soukupova, H., Schikora, A., Zarsky, V., & Hirt H. 2006. A mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **281**, p. 38697–38704.
- Naseem, M., Kunz, M. & Dandekar, T. 2017. Plant–Pathogen Maneuvering over Apoplastic Sugars. *Plant Science* **22**, p. 740-743.
- Nelson, D.L., & Cox, M. M. 2005. *Lehninger's Principles of Biochemistry, 4th Edition. W. H. Freeman and Company, New York.*
- Nikraftar, F., Taheri, P., Rastegar, M.F., & Tarighi, S. 2013. Tomato partial resistance to *Rhizoctonia solani* involves antioxidative defense mechanisms. *Physiol Mol Plant Pathol* **81**, p. 74–83.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y., & Shigeoka, S. 2008. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology* **147**, p. 1251–1263.
- Osborn, A.E. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* **8**, p. 1821–1831.
- Osman, M. & Valadon, L.R.G. 1979. EFFECT OF LIGHT QUALITY ON GROWTH AND SPORULATION IN VERTICILLIUM AGARICINUM. *The British Mycological Society* **72**(1), p. 145–46.
- Osuna, D., Usadel, B., Morcuende, R., Gibon, Y., Blasing, O.E., Höhne, M., Günter, M., Kamlage, B., Trethewey, R., Scheible, W., & Stitt, M. 2007. Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal* **49**, p. 463-491.
- Pandey, S.P., & Somssich, I.E. 2009. The Role of WRKY Transcription Factors in. *Plant Physiology* **150**(August), p. 1648–55.
- Parisi, L., & Lespinasse, Y. 1996. Pathogenicity of *Venturia inaequalis* strains of race 6 on apple clones (*Malus sp.*). *Plant Disease* **80**, p. 1179–1183.
- Park, S.-W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., & Klessig, D.F. 2007. Methyl salicylate

- is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* **318**, p. 113–116.
- Pastor, V., Luna, E., Mauch-Mani, B., Ton, J. & Flors, V. 2012. Primed plants do not forget. *Environmental and Experimental Botany* **94**, p. 46-56.
- Peshev, D., Vergauwen, R., Moglia, A., Hideg, E., & van den Ende, W. 2013. Towards understanding vacuolar antioxidant mechanisms: a role for fructans? *Journal of Experimental Botany* **64**, p. 1025–1038.
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E., *et al.* 2000. Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**, p. 1111–1120.
- Petkovsek, Stampar & Veberic. 2007. Parameters of inner quality of the apple scab resistant and susceptible apple cultivars (*Malus domestica* Borkh.). *Scientia Horticulturae* **114**(1), p. 37-44.
- Pieterse, C.M.J., & Dicke, M. 2007. Plant interactions with microbes and insects: From molecular mechanisms to ecology. *Trends in Plant Science* **12**(12), p. 564-569.
- Pozo, M.J., Van Der Ent, S., Van Loon, L.C., & Pieterse, C.M.J. 2008. Transcription factor MYC2 is involved in priming for enhanced defence during rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* RID A-9326-2011. *New Phytol.* **180**, p. 511–523.
- Raa, J. 1968. *Natural resistance of Apple Plants to Venturia inaequalis*. Ph.D. thesis. Univ, Utrecht, Utrecht, The Netherlands. P. 1-100.
- Ramegowda, V., & Senthil-Kumar, M. 2015. The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: mechanistic understanding from drought and pathogen combination. *J. Plant Physiol.* **176**, p. 47–54.
- Reddy, V.S., & Reddy, A.S.N. 2004. Proteomics of Calcium-Signaling Components in Plants. *Phytochemistry* **65**, p. 1745–76.
- Reina-Pinto, J.J., & Yephremov, A. 2009. Surface lipids and plant defences. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**, p. 540–549.
- Ren, D.T., Yang, H.P., & Zhang, S.Q. 2002. Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* **277**, p. 559–565.
- Reymond, P., Grünberger, S., Kalanthee, P., Müller, M. & Farmer, E.E. 1995. Oligogalacturonide Defense Signals in Plants: Large Fragments Interact with the Plasma Membrane *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, p. 4145–49.
- Robinson, R. A. 1976. *Plant Pathosystems*. Advanced Series in Agricultural Sciences 3. Springer-Verlag. Berlin. p. 1-184.
- Rodriguez, M.C.S., Petersen, M., & Mundy, J. 2010. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**, p. 621–649.
- Rohila, J.S., & Yang, Y.N. 2007. Rice mitogen-activated protein kinase gene family and its role in biotic and abiotic stress response. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**, p. 751–759.
- Roitsch, T. 1999. Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, p. 198-206.
- Roitsch, T., Balibrea, M.E., Hofmann, M., Proels, R., & Sinha, A.K. 2003. Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *Journal of Experimental Botany* **54**, p. 513–524.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., & Sheen, J. 2006. Sugar sensing and signalling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**, p. 675–709.
- Rosenberger, D. 2016. RIMpro as a Tool for Management of Apple Scab. p. 1–3.
- Rosenzweig, C., Iglesias, A., Yang, X.B., Epstein, P.R., & Chivian, E. 2001. Climate Change and Extreme Weather Events - Implications for Food Production, Plant Diseases, and

- Pests. *GLOBAL CHANGE & HUMAN HEALTH* **2**, p. 90-104.
- Rossi, V., Ponti, I., Marinelli, M., Giosue, S., & Bugiani, R. 2001. Environmental factors influencing the dispersal of *Venturia inaequalis* ascospore in orchards air. *Journal of Fythopathology* **149**, p. 11-19.
- Ruan, Y. 2014. Sucrose metabolism: Gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annual Review of Plant Biology* **65**, p. 33-67.
- Rushton, P.J., Torres, J.T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K., & Somssich, I.E. 1996. Interaction of Elicitor-Induced DNA-Binding Proteins with Elicitor Response Elements in the Promoters of parsley PR1 genes. *The EMBO Journal* **15**(20), p. 5690–5700.
- Savary, S., Ficke, A., Aubertot, J.N. & Hollier, C. 2012. Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Sec.* **4**, p. 519-537.
- Savatin, D.V., Gramegna, G., Modesti, V., & Cervone, F. 2014. Wounding in the Plant Tissue : The Defense of a Dangerous Passage. *Frontiers in Plant Science* **5**, p. 1–11.
- Schonherr, J. 2006. Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. *J. Exp. Bot.* **57**, p. 2471–2491.
- Schulze-Lefert, P., & Panstruga, R. 2003. Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming of host cells for disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**, p. 641–667.
- Schwabe, W.F.S. 1979. Changes in scab susceptibility of apple leaves as influenced by age. *Phytophylactica* **11**, p. 53-56.
- Schweikert, C., Liszskay, A., & Schopfer, P. 2000. Scission of polysaccharides by peroxidase-generated hydroxyl radicals. *Phytochemistry* **53**, p. 565–570.
- Schymanski, S.J. & Or, D. 2015. Wind effects on leaf transpiration challenge the concept of “potential evaporation”. *IAHS* **371**, p. 99-107.
- Shah, J., & Zeier, J. 2013. Long-Distance Communication and Signal Amplification in Systemic Acquired Resistance. *Frontiers in Plant Science* **4**, p. 1–16.
- Shanker, A.K., & Shanker, C. 2016. Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives. *Intech*, p. 1-768.
- Sheen, J. 2014. Master Regulators in Plant Glucose Signaling Networks. *J. Plant Biol* **57**, p. 67–79.
- Sheen, J., Zhou, L., & Jang, J.C. 1999. Sugars as signaling molecules. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, p. 410–418.
- Shi, H-B., Liang, S., Huang, L.-Y., Liu, X.-H., Zhu, X.-M., Zhao, Y.-H., & Lin, F.-C. 2016. Autophagy in Current Trends in Cellular Physiology and Pathology. *Autophagy in Plant Pathogenic Pathogenic Fungi Autophagy Fungi* **12**, p. 221–41.
- Sinha, S.K., & Swaminathan, M.S. 1991. Deforestation, climate change and sustainable nutrition security. *Clim change* **16**, p. 33-45.
- Slaughter, A., Daniel, X., Flors, V., Luna, E., Hohn, B., & Mauch-Mani, B. 2012. Descendants of Primed Arabidopsis Plants Exhibit Resistance to Biotic Stress 1. *Plant Physiology* **158**, p. 835–43.
- Smeekens, S., & Hellmann, H.A. 2014. Sugar sensing and signaling in plants. *Front. Plant Science* **5**, p. 113.
- Smeekens, S., Ma, J., Hanson, J., & Rolland, F. 2010. Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**, p. 274–279.
- Smith, J.L., De Moraes, C.M., & Mescher, M.C. 2009. Jasmonate- and salicylate- mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants. *Pest Management Science* **65**, p. 497-503.
- Solfanelli, C., Poggi, A., Loreti, E., Alpi, A., & Perata, P. 2006. Sucrose- specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in Arabidopsis. *Plant Physiology* **140**, p. 637–

- Soriano, J.M., Joshi, S.G., van Kaauwen, M., Noordijk, Y., Groenwold, R., Henken, B., van de Weg, W.E., & Schouten, H.J. 2009. Identification and mapping of the novel apple scab resistance gene Vd3. *Tree Genetics and Genomes* **5**(3), p. 475–482.
- Soriano, J.M., Joshi, S.G., van Kaauwen, M., Noordijk, Y., Groenwold, R., Henken, B., van de Weg, W.E., & Schouten, H. J. 2009. Identification and Mapping of the Novel Apple Scab Resistance Gene Vd3. *Tree Genetics & Genomes* **5**, p. 475–82.
- Spoel, S.H., *et al.* 2009. Proteasome-mediated turnover of the transcription co-activator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. *Cell* **137**, p. 860–872.
- Stael, S.P., Kmicik, P., Willems, K., Van Der Kelen, N.S., Coll, M., Teige & Van Breusegem, F. 2015. Plant innate immunity – Sunny side up? *Trends in Plant Science* **20**(1), p. 3-11.
- Stotz, H.U., Waller, F., & Wang, K. 2013. Innate Immunity in Plants: The Role of Antimicrobial Peptides. p.29–52.
- Stoyanova, S., Geuns, J., Hideg, E., & van den Ende, W. 2011. The food additives inulin and stevioside counteract oxidative stress. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **62**, p. 207–214.
- Struck, C. 2006. Chapter 4: Infection strategies of plant parasitic fungi. In: Cooke, B.M. Jones, D.G. & Kaye, B. (Editors), *The Epidemiology of Plant Diseases*, Springer, p. 117- 137.
- Suarez-Rodriguez, M.C., Adams-Phillips, L., Liu, Y., Wang, H., Su, S.H., Jester, P.J., Zhang, S., Bent, A.F., & Krysan, P.J. 2007. MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in Arabidopsis plants. *Plant Physiology* **143**, p. 661–669.
- Sun, F., Zhang, P., Guo, M., Yu, W., & Chen, K. 2013. Burdock fructooligosaccharide induces fungal resistance in postharvest Kyoho grapes by activating the salicylic acid-dependent pathway and inhibiting browning. *Food Chem.* **138**, p. 539–546.
- Suzuki, N., Rivero, R.M., Shulaec, V., Blumwald, E., & Mittler, R. 2014. Tansley Review Abiotic and Biotic Stress Combinations. *New Phytologist* **203**, p.32-43.
- Szankowski, I., Waidmann, S., Degenhardt, J., Patocchi, A., Paris, R., Silfverberg-Dilworth, E., Brogini, G., & Gessler, C. 2009. Highly scab-resistant transgenic apple lines achieved by introgression of HcrVf2 controlled by different native promoter lengths. *Tree Genetics and Genomes* **5**(2), p. 349–358.
- Tadege, M., Bucher, M., Stähli, W., Suter, M., Dupuis, I. & Kuhlemeier, C. 1998. Activation of plant defense responses and sugar efflux by expression of pyruvate decarboxylase in potato leaves. *Plant J.* **16**, p. 661–671.
- Takahashi, F., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Ichimura, K., & Shinozaki, K. 2011. Calmodulin-dependent activation of MAP kinase for ROS homeostasis in Arabidopsis. *Molecular Cell* **41**, p. 649–660.
- Tarkowski, Ł.P., & van den Ende, W. 2015. Cold tolerance triggered by soluble sugars: a multifaceted countermeasure. *Front Plant Science* **6**, p. 203.
- Tauzin, A.S., & Giardina, T. 2014. Sucrose and Invertases, a Part of the Plant Defense Response to the Biotic Stresses RESPONSE. *Frontiers in Plant Science* **5**, p. 1–8.
- Tena, G., Boudsocq, M., & Sheen, J. 2011. Protein Kinase Signaling Networks in Plant Innate Immunity. *Curr Opin Plant Biol* **14**(5), p. 519–29.
- Teng, S., Keurentjes, J., Bentsink, L., Koornneef, M., & Smeekens, S. 2005. Sucrose-specific induction of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis requires the MYB75/PAP1 gene. *Plant Physiol.* **139**, p. 1840– 1852.
- Thibaud, M.C., Gineste, S., Nussaume, L., & Robaglia, C. 2004. Sucrose increases pathogenesis-related PR-2 gene expression in Arabidopsis thaliana through an SA-dependent but NPR1-independent signaling pathway. *Plant Physiol. Biochem.* **42**, p.

81–88.

- Thulke, O.U., & Conrath, U. 1998. Salicylic acid has a dual role in the activation of defence-related genes in parsley. *Plant J.* **14**, p. 35–42.
- Toksoy, E., Hernández, L., & Combie, J. 2016. Review of levan polysaccharide: from a century of past experiences to future prospects. *Biotech. Adv.* **34**, p. 827–844.
- Trapman, M., & Polfliet, M. 1997. Management of primary infections of Apple-scab with the simulation program RIMpro: review of four years field trials. *IOBC wprs Bulletin* **20**, p. 241-250.
- Trouvelot, S., Héloir, M., Poinssot, B., Gauthier, A., Paris, F., Guillier, C., Combiere, M., Trdá, L., Daire, X., & Adrian, M. 2014. Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. *Frontiers in Plant Science* **5**(592), p. 1-14.
- Tsuda, K., Sato, M., Glazebrook, J., Cohen, J.D., & Katagiri, F. 2008. Interplay between MAMP triggered and SA-mediated defense responses. *Plant J.* **53**, p. 763–775.
- Turechek, W.W. 2004. *Apple diseases and their management: Diseases of fruits and vegetables: Diagnosis and management Volume I.* Naqvi, S.A.M.H. (ed.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 1-108.
- USDA. 2017. Fresh Deciduous Fruit: World Markets and Trade (Apples, Grapes & Pears. *Fresh apples*, p. 1.
- Valluru, R., & van den Ende, W. 2008. Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. *J. Exp. Bot.* **59**, p. 2905–2916.
- Valluru, R., & van den Ende, W. 2011. Myo-inositol and beyond: Emerging networks under stress. *Plant Science* **181**, p. 387-400.
- Valluru, R., Lammens, W., Clau-pein, W., & van den Ende, W. 2008. Freezing tolerance by vesicle-mediated fructan transport. *Trends Plant Science* **13**, p. 409–414.
- van Baarlen, P., Legendre, L., & van Kan, J.A.L. 2007. Botrytis: Biology, Pathology and Control. *Defence Compounds Against Botrytis Infection*. p. 143-155.
- van den Ende, W., De Coninck, B., Clerens, S., Vergauwen, R. & Van Laere, A. 2003b. Unexpected presence of fructan exohydrolases (6-FEHs) in non-fructan plants: characterization, cloning, mass mapping and functional analysis of a novel ‘cell-wall invertase-like’ specific 6-FEH from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Journal* **36**, p. 697–710.
- van den Ende, W., De Coninck, B. & Van Laere, A. 2004. Plant fructan exohydrolases: a role in signaling and defense? *Plant Science* **9**, p. 1360-1385.
- van den Ende, W., & El-Esawe, S.K. 2014. Sugar signaling pathways leading to fructan and anthocyanin accumulation: a dual function in abiotic and biotic stress responses? *Environ Exp. Bot.* **108**, p. 4–13.
- van den Ende, W., & Valluru, R. 2009. Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging? *Journal of Experimental Botany* **60**, p. 9–18.
- van den Ende, W. 2013. Multifunctional Fructans and Raffinose Family Oligosaccharides. *Frontiers in Plant Science* **4**(247), p. 1–11.
- van den Ende, W., De Coninck, B., & van Laere, A. 2004. Plant fructan exohydrolases: a role in signaling and defense? *Trends in Plant Science* **9**, p. 523–528.
- Van Loon, L.C., Rep, M., & Pieterse, C.M.J. 2005. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **44**, p. 135–162.
- Van Melckebeke, J. 1990. La lutte intégrée permet-elle de limiter l'utilisation de produits phytopharmaceutiques? *Agricontact* **23**, p. 1-5.
- van Wees, S.C.M., Van der Ent, S., & Pieterse, C.M.J. 2008. Plant immune responses triggered by beneficial microbes RID B-8595-2011 RID A-9326-2011. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**, p. 443–448.

- Veloso, J., García, T., Bernal, A., & Díaz, J. 2014. New bricks on the wall of induced resistance: Salicylic acid receptors and transgenerational priming. *European Journal of Plant Pathology* **138**, p. 685-693.
- Vereyken, I.J., Chupin, V., Demel, R.A., Smeekens, S.C.M., & De Kruijff, B. 2001. Fructans insert between the headgroups of phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta Biomem.* **1510**, p. 307–320.
- Verhagen, B.W.M., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H.S., van Loon, L.C., & Pieterse, C.M.J. 2004. The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Ara- bidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **17**, p. 895–908.
- Versluys, M. 2016. Sweet Immunity in Tobacco: Sugar Priming against *Botrytis Cinerea* Infection. p. 1-71.
- Versluys, M., Tarkowski, L.P., & van den Ende, W. 2017. Fructans As DAMPs or MAMPs: Evolutionary Prospects, Cross-Tolerance, and Multistress Resistance Potential. *Frontiers in Plant Science* **7**, p. 1–7.
- Verspreet, J., Holmgaard Hanse, A., Harrison, S.J., Vergauwen, R., van den Ende, W. & Courtin, C.M. 2017. Building a fructan LC–MS2 library and its application to reveal the fine structure of cereal grain fructans. *Science* **174**, p. 343-351.
- Vidhyasekaran, P. 2014c. Chapter 4: Calcium ion signaling system – calcium signatures and sensors. In: Vidhyasekaran, P. (Editor), *PAMP signals in plant innate immunity*, Springer, p. 207-282.
- Vinatzer, B.A., Patocchi, A., Gianfranceschi, L., Tartarini, S., Zhang, H.-B., Gessler, C., & Sansavini, S. 2001. Apple contains receptor-like genes homologous to the *Cladosporium fulvum* resistance gene family of tomato with a cluster of genes cosegregating with Vf apple scab resistance. *Molecular Plant- Microbe Interactions* **14**(4), p. 508–515.
- VLAM Marketingdienst. 2017. Belgisch fruit: productie (in HA). *Fruitbarometer* **2017**, p. 1.
- VLAM Marketingdienst. 2017. Belgisch fruit: productie (in ton), *Fruitbarometer* **2017**, p. 1.
- VLAM. 2014. Het verbruik van agrovoedingsproducten in België in 2014. p. 2.
- Voegelé, R.T., Wirsel, S., Möll, U., Lechner, M., Mendgen, K. 2006. Cloning and characterization of a novel invertase from the obligate biotroph *Uromyces fabae* and analysis of expression patterns of host and pathogen invertases in the course of infection. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, p. 625–634.
- Wulandari, N., To-Anun, C., Hyde, K., Duong, L., de Gruyter, J., Meffert, J., Groenewald, J., Crous, P. 2009. *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of Citrus tan spot of *Citrus maxima* in Asia. *Fungal Divers* **34**, p. 23–39.
- Wagner, T.A., & Kohorn, B.D. 2001. Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. *Plant Cell* **13**, p. 303–318.
- Walton, J.D. 1994. Deconstructing the Cell Wall. *Plant Physiol* **104**, p.1113-1118.
- Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Culler, A.H., & Dong, X. 2007. Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Current Biology* **17**(20), p. 1784-1790.
- Wang, F., Feng, G., & Chen, K. 2009. Defense responses of harvested tomato fruit to burdock fructooligosaccharide, a novel potential elicitor. *Postharv. Biol. Technol.* **52**, p. 110–116.
- Wang, Z.-Y., Xiong, L., Li, W., Zhu, J.-K. & Zhu, J. 2011. The Plant Cuticle Is Required for Osmotic Stress Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis and Osmotic Stress Tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **23**, p. 1971–84.
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wied- erhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Métraux, J.-P., & Ryals, J.A. 1991. Coordinated gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* **3**, p. 1085–1094.
- Way, R.D., Alwinckle, H.S., Lamb, R.C., Rejman, A., Sansavini, S., Shen, T., Watkins, R.,

- Westwood, M.N., & Yoshida, Y. 1991. Apples (*Malus*). *Acta Hort* **290**, p. 3–62.
- Wiemken, A., Sprenger, N., & Boller, T. 1995. Fructan: an extension of sucrose by sucrose. Pontis, H.G. Salerno, G.L. & Echeverria, E.J. (Editors), *Sucrose, Metabolism, Biochemistry, Physiology and Molecular Biology*. Rockville, MD, USA: *American Society of Plant Physiologists*. p. 178–189.
- Winkel-Shirley, B. 2001. Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* **126**, p. 485–493.
- Wittstock, U., & Gershenzon, J. 2002. Constitutive Plant Toxins and Their Role in Defense against Herbivores and Pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, p. 1–8.
- Xiang, L., Le Roy, K., Bolouri-Moghaddam, M.R., Vanhaecke, M., Lammens, W., Rolland, F., & van den Ende, W. 2011. Exploring the neutral invertase-oxidative stress defence connection in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **62**, p. 3849–3862.
- Xiong, L., & Zhu, J. 2003. Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiology* **133**(1), p. 29–36.
- Xu, H., & Mendgen, K. 1997. Targeted Cell Wall Degradation at the Penetration Site of Cowpea Rust Basidiosporelings. *Molecular Plant - Microbe Interaction* **10**(1), p. 87–94.
- Xu, M., & Korban, S.S. 2002. A cluster of four receptor-like genes resides in the Vf locus that confers resistance to apple scab disease. *Genetics* **162**(4), p. 1995–2006.
- Yasuda M., Ishikawa A., Jikumaru Y., *et al.* 2008. Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **20**, p. 1678–1692.
- Yamada, K., Saijo, Y., Nakagami, H. & Takano, Y. 2016. Regulation of sugar transporter activity for antibacterial defense in *Arabidopsis*. *Science* **354**, p. 1427–1430.
- Yang, Y., Shah, J., & Klessig, D.F. 1997. Signal Perception and Transduction in Plant Defense Responses. *GENES & DEVELOPMENT* **11**, p. 1621–39.
- Yu, S.-M. 1999. Cellular and genetic responses of plants to sugar starvation. *Plant Physiol.* **121**, p. 687–693.
- Yun, B.W., Feechan, A. Yin, M., Saidi, N.B., Le Bihan, T., Yu, M., Moore, J.W., Kang, J.G., Kwon, E., Spoel, S.H., Pallas, J.A., & Loake, G.J. 2011. S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* **478**, p. 264–268.
- Zhang, A.Y. Jiang, M.Y. Zhang, J.H. Tan, M.P. & Hu, Z.L. 2006. Mitogen- activated protein kinase is involved in abscisic acid-induced antioxidant defence and acts downstream of reactive oxygen species production in leaves of maize plants. *Plant Physiology* **141**, p. 475–487.
- Zhang, P.Y., Wang, J.C., Liu, S.H., & Chen, K.S. 2009. A novel burdock fructooligosaccharide induces changes in the production of salicylates, activates defence enzymes and induces systemic acquired resistance to *Colletotrichum orbiculare* in cucumber seedlings. *J. Phytopathol.* **157**, p. 201–207.
- Zhang, T., Liu, Y., Yang, T., Zhang, L., Xu, S., Xue, L., & An, L. 2006. Diverse signals converge at MAPK cascades in plant. *Plant Physiology and Biochemistry* **44**, p. 274–283.
- Zucoloto, M., Ku, K.-M., Kim, M.-J., & Kushad, M. M. 2017. Influence of 1-Methylcyclopropene Treatment on Postharvest Quality of Four Scab (*Venturia Inaequalis*) -Resistant Apple Cultivars. *Journal of Food Quality* **2017**, p. 1-12.

Vulgariserende samenvatting

Appel is een wereldwijd belangrijk gewas met een groot economisch belang. De sector heeft echter te maken met grote economische verliezen door ziekten, zoals appelschurft die zorgen voor een lagere productie en veel onverkoopbare vruchten. Telers bestrijden deze schimmelziekte regelmatig met gewasbeschermingsmiddelen die niet alleen duur zijn, maar ook niet als milieuvriendelijk en duurzaam worden beschouwd. Daarnaast leidt het (te) veel gebruiken van deze middelen ook tot het ontstaan van schurftstammen die niet meer gevoelig zijn aan de gewasbeschermingsmiddelen. Daarom wordt naar alternatieve middelen gezocht om deze schimmelziekte beter te kunnen bestrijden. Eén van de mogelijkheden is het ‘sweet immunity’ concept, waarbij suikers de verdediging van planten tegen ziekten en plagen zouden kunnen verhogen bij een volgende infectie.

In dit eindwerk testen we de werking van dit concept bij appelbladeren tegen appelschurft met enkele veelbelovende suikers. We besproeiden de drie jongste en meest schurftgevoelige appelbladeren met drie verschillende fructaansuikers (graminanen, inulinen en levanen) en drie dagen later werden deze bladeren geïnfecteerd met schimmelsporen. Vervolgens werd de schimmelgroei opgevolgd in de tijd op zowel visueel als DNA niveau. Hiernaast werden ook suikerconcentraties van bladstalen gemeten om zo mogelijke effecten van een vermindering van de symptomen op de bladeren te kunnen linken aan de veranderingen van deze suikers.

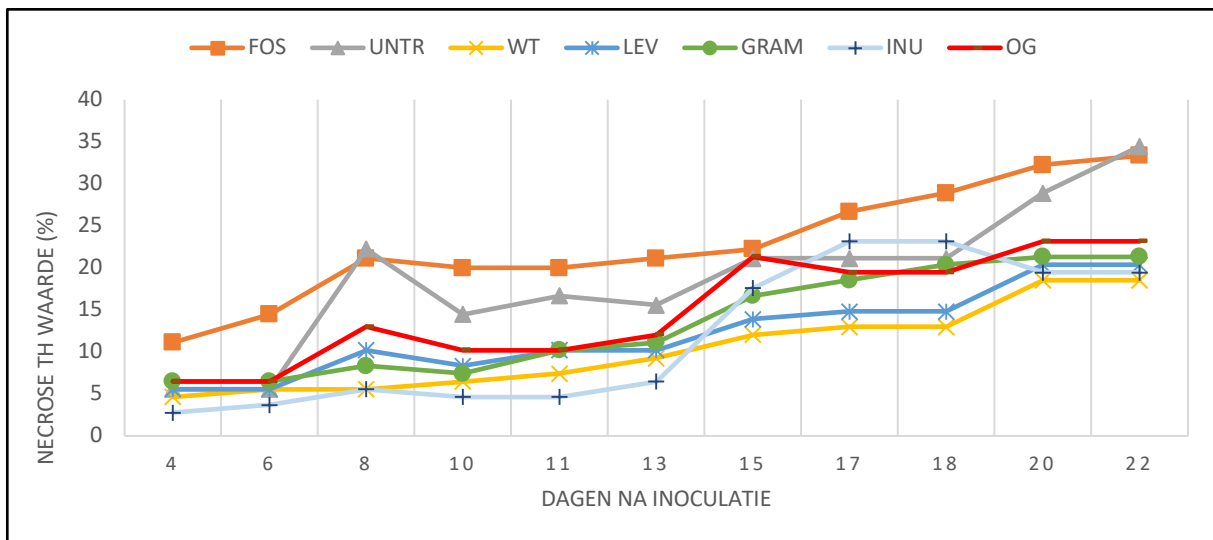
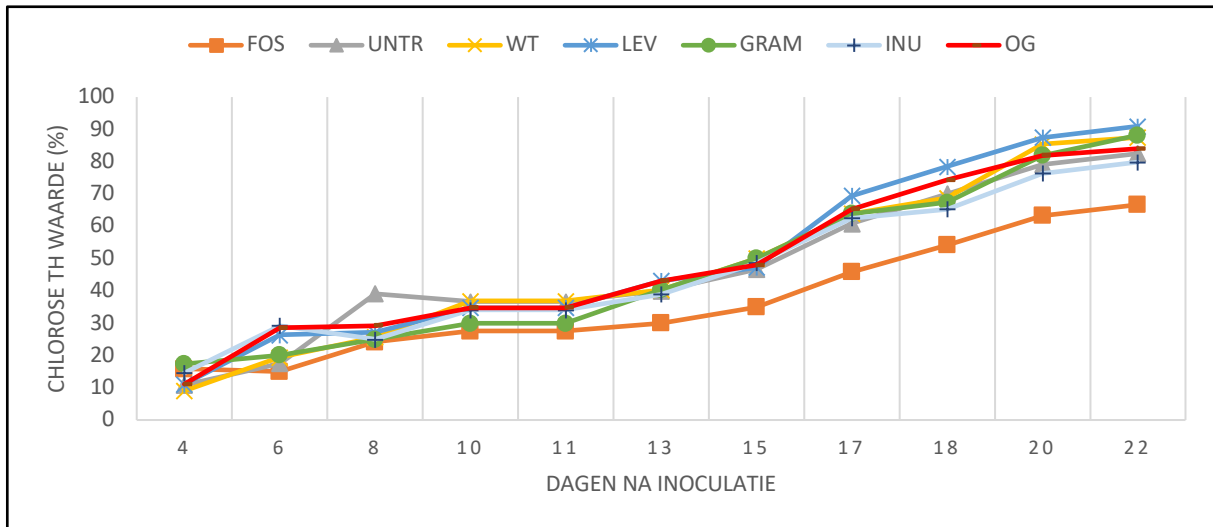
Uit de resultaten blijken de suikermoleculen, graminanen, de schimmelgroei niet te verminderen op de appelbladeren. Daarnaast lijken inulinen de schimmelgroei op de appelbladeren eerder te bevorderen en dus worden ze eerder voedingsbron gebruikt door de schimmel, terwijl levanen wel zorgen voor minder schimmelgroei. In de appelbladeren die behandeld waren met levanen daalt de totale suikerconcentratie. Hieruit kunnen we besluiten dat er voldoende suikers aanwezig moeten zijn in de appelbladeren opdat de schimmel de bladeren kan infecteren en hierin verder groeien.

Bijlagen

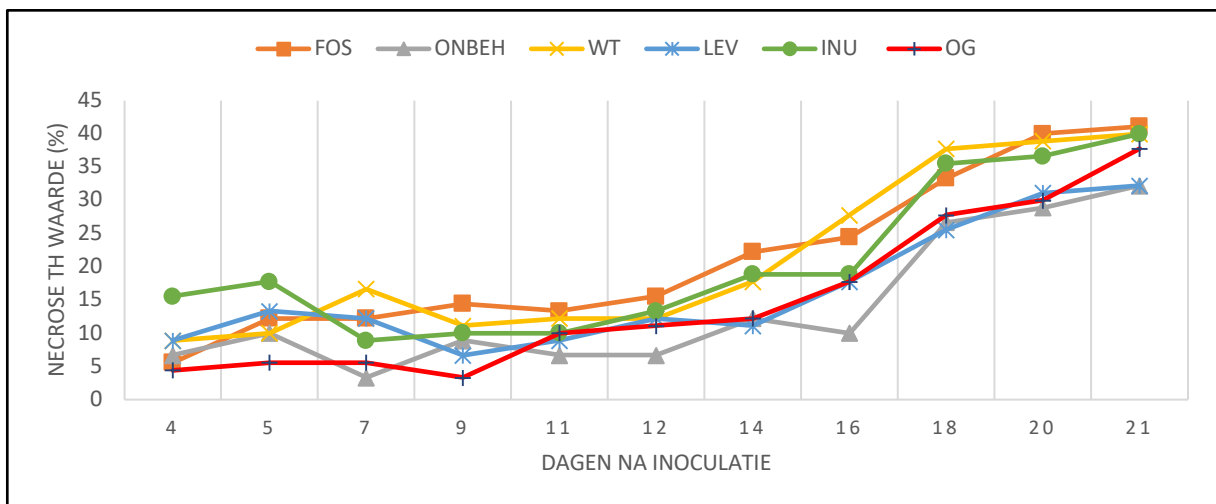
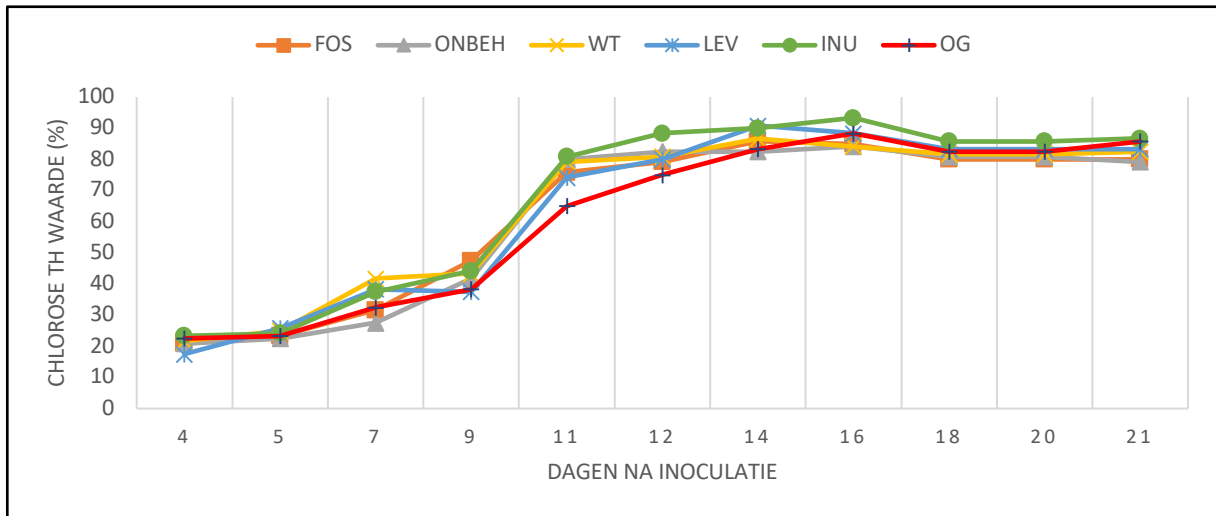
Bijlage 1: Factoren die de pathogeniciteit en virulentie van *V. inaequalis* bepalen bij appelbladeren (Jha et al., 2009).

Locus/Gene	Associated functions
Avirulence factors	
<i>avrVf</i> (<i>avrRvi6</i>)	Avirulent on apple cultivars containing <i>Vf</i> (<i>Rvi6</i>)
<i>avrVg</i> (<i>avrRvi1</i>)	Avirulent on apple cultivars containing <i>Vg</i> (<i>Rvi1</i>)
<i>avrVm</i> (<i>avrRvi5</i>)	Avirulent on apple cultivars containing <i>Vm</i> (<i>Rvi5</i>)
<i>avrVh2</i> (<i>avrRvi2</i>)	Avirulent on apple cultivars containing <i>Vh2</i> (<i>Vr2</i> ; <i>Rvi2</i>)
<i>avrVfh</i> (<i>avrRvi7</i>)	Avirulent on apple cultivars containing <i>Vfh</i> (<i>Rvi7</i>)
<i>avrVh8</i> (<i>avrRvi8</i>)	Avirulent on apple cultivars containing <i>Vh8</i> (<i>Rvi8</i>)
<i>avrVd</i> (<i>avrRvi13</i>)	Avirulent on apple cultivars containing <i>Vd</i> (<i>Rvi13</i>)
Cell Wall Degrading enzymes (CWDEs)	Promote pathogen entry into the host and facilitates nutrients uptake
Cellulase	”
β -D-glucosidase	”
Polygalacturonase (endo-PG & Exo-PG)	”
Cutinase	Assists pathogen in cuticle penetration and sub-cuticular growth
Esterase	Assists pathogen in cuticle penetration by softening cutin
Melanoprotein	Assists in slow release of CWDEs and diverting the solute/nutrient flow towards the site of infections
Cellophane induced	
<i>Cin1</i>	Induced during apple infections
<i>Cin3</i>	Induced during apple infections

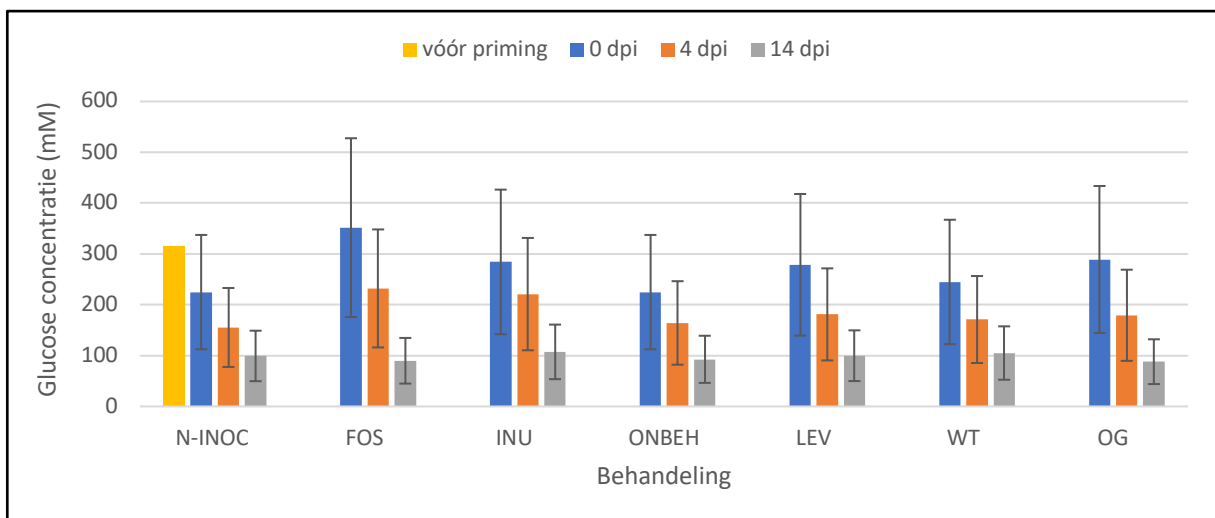
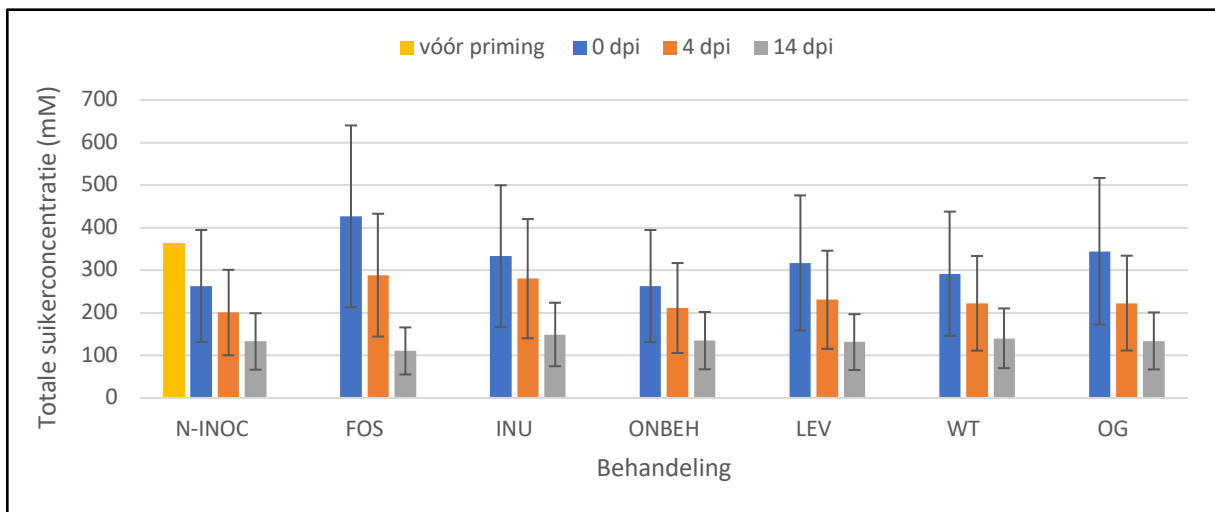
Bijlage 2: De visuele evaluaties van het eerste experiment gebaseerd op blad 1, 2 en 3 voor alle behandelingen. a) De gemiddelde chlorosegraden opgevolgd in de tijd. b) De gemiddelde necrosegraden opgevolgd in de tijd. De foutbalken geven het gemiddelde ± 1 standaardfout weer.

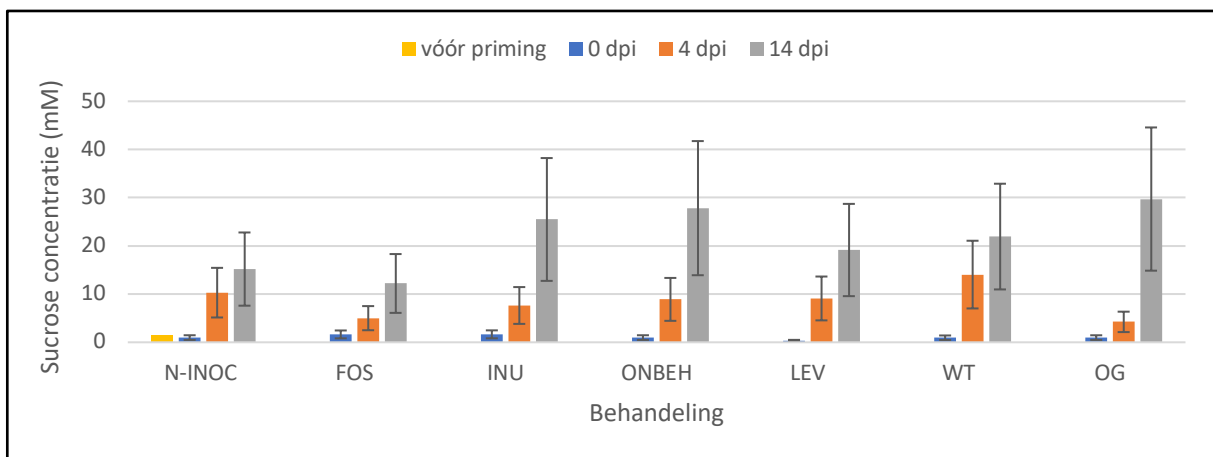
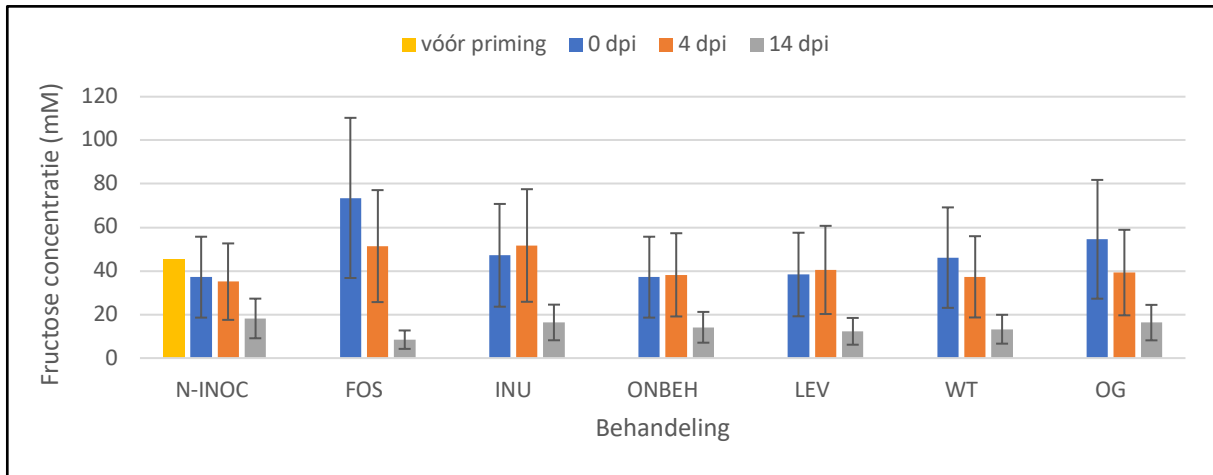


Bijlage 3: De visuele evaluaties van het tweede experiment gebaseerd op blad 1, 2 en 3 voor alle behandelingen. a) De gemiddelde chlorosegraden opgevolgd in de tijd. b) De gemiddelde necrosegraden opgevolgd in de tijd. De foutbalken geven het gemiddelde ± 1 standaardfout weer.

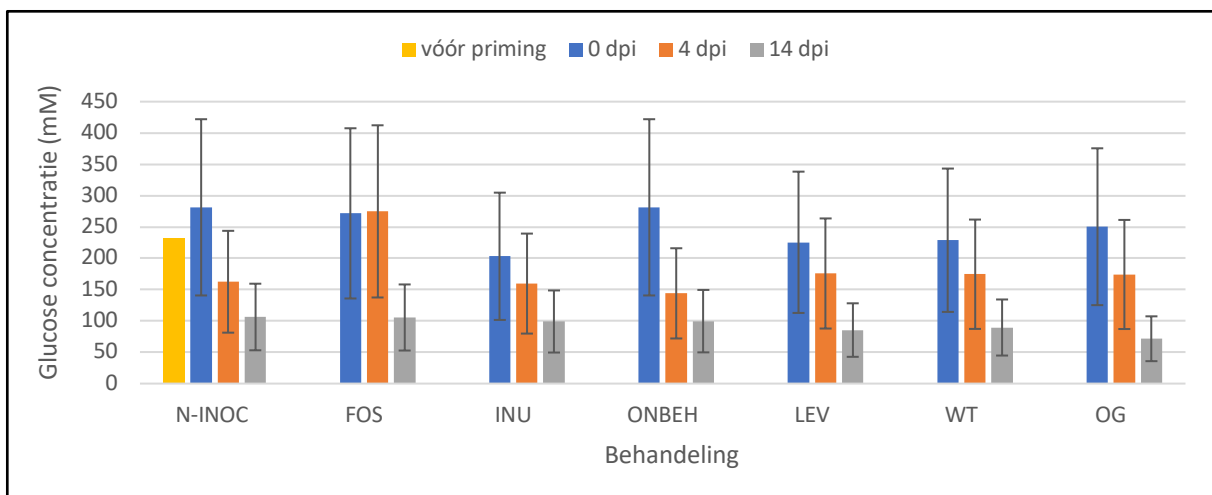
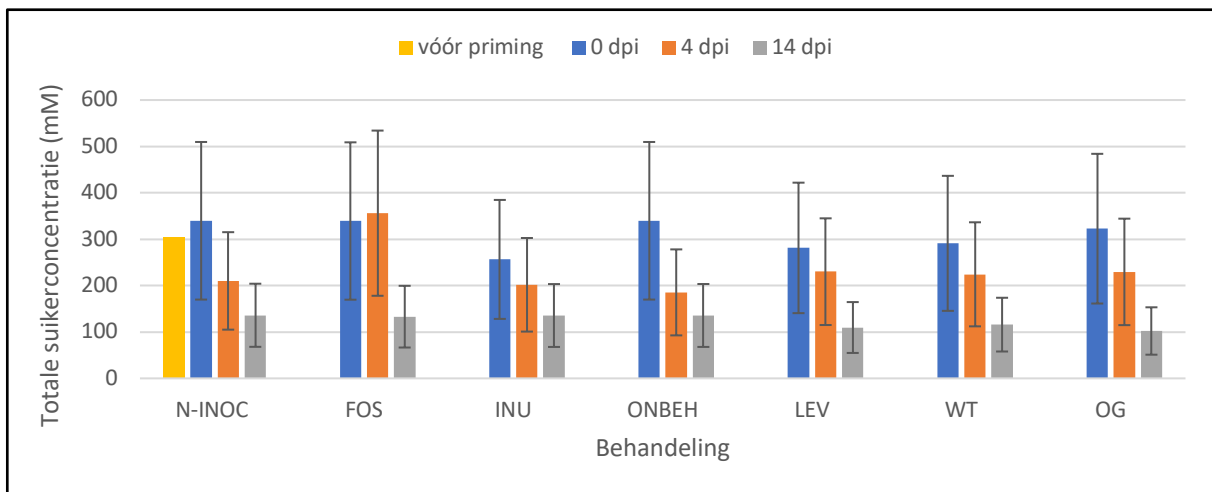


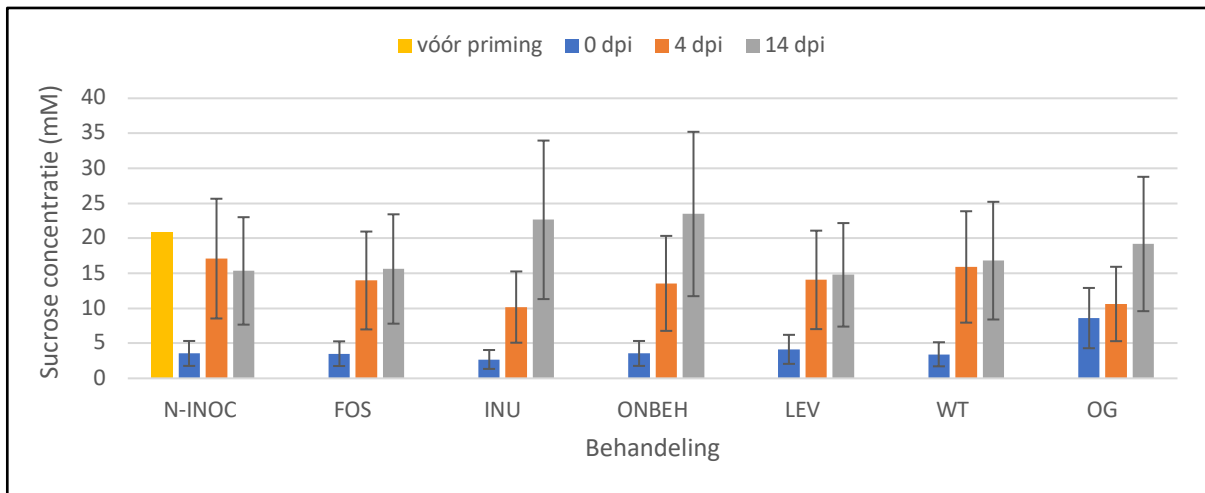
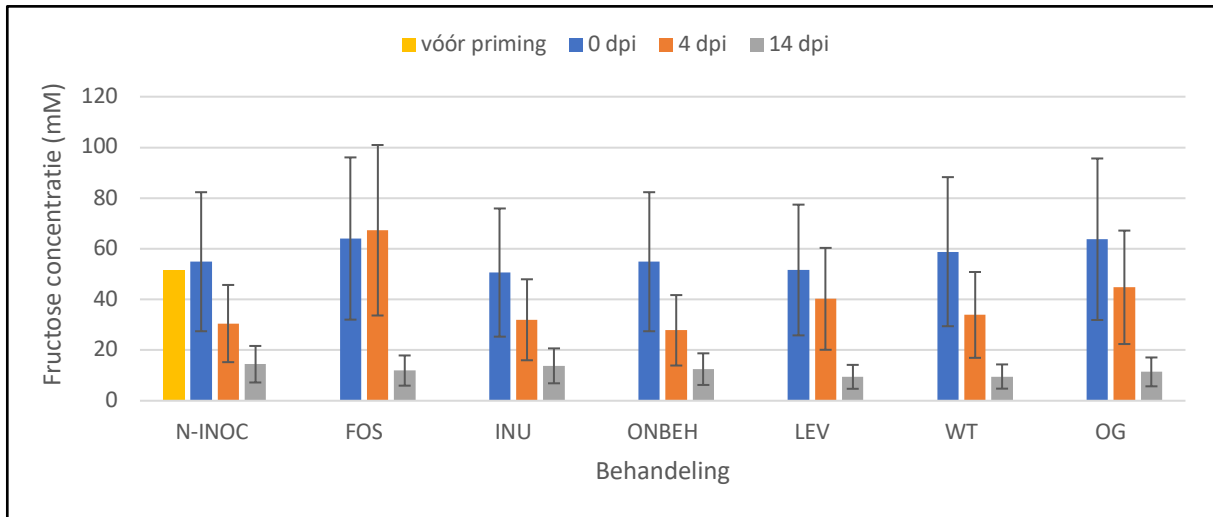
Bijlage 4: Totaal suikergehalte, glucose, fructose en sucrose, bij bladstalen gebaseerd op blad 1 vóór de priming, net vóór de inoculatie (0 dpi), 4 en 14 dagen na inoculatie (4 en 14 dpi) met conidiosporen van *V. inaequalis* voor alle behandelingen. a) De gemiddelde totale suikerconcentraties (Wilcoxon rank sum test, $\alpha = 0.05$; N = 4). b) De gemiddelde glucose concentraties (Wilcoxon rank sum test, $\alpha = 0.05$; N = 4). c) De gemiddelde fructose concentraties (Wilcoxon rank sum test, $\alpha = 0.05$; N = 4). d) De gemiddelde sucrose concentraties (Wilcoxon rank sum test, $\alpha = 0.05$; N = 4). Voor de totale suiker, glucose, fructose en sucrose concentratie van de niet geprimede en niet geïnoculeerde planten op 0 dpi werden deze waarden overgenomen van de onbehandelde planten op 0 dpi. Er was maar één datawaarde beschikbaar voor de totale suiker, glucose, fructose en sucrose concentratie van de planten vóór priming, waardoor er geen foutenbalk kan weergegeven worden. Bij 0 dpi wordt een asterisk gebruikt om significante verschillen aan te duiden met vóór priming. Bij 14 dpi wordt een asterisk gebruikt om significante verschillen aan te duiden met N-INOC op 14 dpi (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.005$). De foutbalken geven het gemiddelde \pm 1 standaardfout weer.





Bijlage 5: Totaal suikergehalte, glucose, fructose en sucrose, bij bladstalen gebaseerd op blad 2 vóór de priming, net vóór de inoculatie (0 dpi), 4 en 14 dagen (4 en 14 dpi) na inoculatie met conidiosporen van *V. inaequalis* voor alle behandelingen. a) De gemiddelde totale suikerconcentraties (Wilcoxon rank sum test, $\alpha = 0.05$; $N = 4$). b) De gemiddelde glucose concentraties (Wilcoxon rank sum test, $\alpha = 0.05$; $N = 4$). c) De gemiddelde fructose concentraties (Wilcoxon rank sum test, $\alpha = 0.05$; $N = 4$). d) De gemiddelde sucrose concentraties (Wilcoxon rank sum test, $\alpha = 0.05$; $N = 4$). Voor de totale suiker, glucose, fructose en sucrose concentratie van de niet geprimede en niet geïnoculeerde planten op 0 dpi werden deze waarden overgenomen van de onbehandelde planten op 0 dpi. Er was maar één datawaarde beschikbaar voor de totale suiker, glucose, fructose en sucrose concentratie van de planten vóór priming, waardoor er geen foutenbalk kan weergegeven worden. Bij 0 dpi wordt een asterisk gebruikt om significante verschillen aan te duiden met vóór priming. Bij 14 dpi wordt een asterisk gebruikt om significante verschillen aan te duiden met N-INOC op 14 dpi (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.005$). De foutbalken geven het gemiddelde \pm 1 standaardfout weer.





Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen
Kasteelpark Arenberg 20
3001 LEUVEN-Heverlee, BELGIË
tel. + 32 16 32 16 19
fax + 32 16 32 19 99
www.biw.kuleuven.be

