

Botrytis cinereaの病原性因子

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者	中島, 雅己 阿久津, 克己
巻/号	80巻特集号
掲載ページ	p. 56-64
発行年月	2014年11月

Botrytis cinerea の病原性因子

中島 雅己^{1*}・阿久津克己¹

NAKAJIMA, M.^{1*} and AKUTSU, K.¹ (2014). Virulence factors of *Botrytis cinerea*.

Key words: *Botrytis cinerea*, Extracellular enzymes, Penetration, Phytotoxic activity, Programmed cell death, Virulence factor

はじめに

Botrytis cinerea は、特に温帯地域の重要な多犯性の病原菌であり、多くの野菜や果物、樹木、花卉を含む 200 種以上の植物に灰色かび病を引き起こす。本菌は殺生菌として葉や茎、果実など多くの器官を侵し、しばしば収穫後に大きな損害を与える。本菌はまた、老化した植物や植物残渣上で生育する腐生菌でもある。灰色かび病の防除には抵抗性品種が利用できないため、主要作物については化学的防除が主要な防除法となっているが、圃場における多剤耐性菌の発達により、その効果は不十分なものとなっている。本菌は広い宿主範囲をもち、それによって引き起こされる農業上の被害が大きいことから、病原性のメカニズムを解明するための努力がなされている。これまでに同定された *B. cinerea* の病原性因子を Table 1 に示した。

宿主組織への侵入

罹病植物やその残渣、あるいは発芽した菌核上に形成された分生子は気流によって新たな植物へとまき散らされ、それらが宿主表面へ接触することで伝染環が始まる。宿主表面に付着した分生子は発芽し、発芽管の先端には宿主組織へ侵入するための付着器が形成される。侵入における最初の障壁は植物の表面を覆っているクチクラである。クチクラは主として C₁₆ と C₁₈ のヒドロキシ脂肪酸のポリエステルであるクチンからなり、多くの場合疎水性のワックス層で覆われている。*B. cinerea* によるクチクラの物理的な損傷や機械的な貫入は通常の感染では観察されないことから (Cole *et al.*, 1996; Williamson *et al.*, 1995)、無傷の宿主表面へ

の侵入には酵素が関与すると考えられている (Salinas and Verhoef, 1995)。

ワックス層への貫入

葉や果実表面のワックスは撥水性の表面を作り、それによって病原体の堆積、発芽や増殖の場となるウォーターフィルム形成を妨げている。*B. squamosa* の分生子によるタマネギ葉への感染効率は、接種前に葉のワックス層を拭き取

Table 1. Virulence factors of *Botrytis cinerea*

Virulence factors	Reference
Penetration into the host surface	
lipase	Comménil <i>et al.</i> (1998)
cutinase	Salinas (1992)
Killing of host cells	
botcinolide	Cutler <i>et al.</i> (1993)
sesquiterpenoid metabolites	Durán-Patrón <i>et al.</i> (2000)
botrydial and related metabolites	Colmenares <i>et al.</i> (2002)
botrydial derivatives	Reino <i>et al.</i> (2004)
botcinins E and F	Tani <i>et al.</i> (2006)
Cu-Zn-superoxide dismutase	Rolke <i>et al.</i> (2004)
NADPH oxidases	Segmüller <i>et al.</i> (2008)
endopolygalacturonase1	ten Have <i>et al.</i> (1998)
xylanase	Noda <i>et al.</i> (2010)
Nep1-like proteins	Schouten <i>et al.</i> (2008)
cerato-platanin family protein	Frias <i>et al.</i> (2011)
Conversion of host tissue into fungal biomass	
pectin methylesterase	Valette-Collet <i>et al.</i> (2003)
BcPG1	ten Have <i>et al.</i> (1998)
BcPG2	Kars <i>et al.</i> (2005a)
aspartic protease	Movahedi and Heale (1990b)
Overcoming host defense responses	
BcBir1	Shlezinger <i>et al.</i> (2011a,b)
ATP-binding cassette transporters	Stefanato <i>et al.</i> (2009)

¹ 茨城大学農学部 (〒 300-0393 茨城県稲敷郡阿見町中央 3-21-1) College of Agriculture, Ibaraki University, Ami-machi, Ibaraki 300-0393, Japan

* Corresponding author (E-mail: mnakaji@mx.ibaraki.ac.jp)

この総説は先に Journal of General Plant Pathology の 80 巻 1 号の pp. 15 ~ 23 に掲載された総説 (<http://dx.doi.org/10.1007/s10327-013-0492-0>) の抄訳です。報文としてのプライオリティーは JGPP 掲載の総説にありますので、引用の際には本総説ではなく JGPP の総説を用いるようにご注意ください。

ることで上昇したが (Sutton *et al.*, 1984), ガーベラとバラの花弁におけるワックス層の厚さと *B. cinerea* に対する感受性との間に関連性は見出されなかった (Kerssies and Frinking, 1996). *B. cinerea* は表面の疎水性を低下させ, ワックス層を溶解する界面活性物質を産生しているのかもしれない. *B. cinerea* は, 脂肪酸エステルを誘導因子として加えた培地で培養した場合, 分子量 60 kDa の細胞外リパーゼを産生する. このリパーゼはクチンとワックスの構成要素であることが報告されている長鎖不飽和脂肪酸エステルを分解することが明らかにされている (Comménil *et al.*, 1995). そのリパーゼは典型的なクチナーゼと反応の特性は異なるものの, クチン分解活性を有している (Comménil *et al.*, 1998). ポリクローナル抗体を用いた活性部位の阻害実験により本リパーゼが感染過程に重要な役割を果たしていることが示された. すなわち抗体を処理したトマト葉に分生子を接種したところ, 発芽管はクチクラに侵入することができなかった (Comménil *et al.*, 1998). 抗体による分生子発芽ならびに傷感染への影響は見られなかったことから, リパーゼが宿主表面からの侵入に特異的に作用していることが示唆された. リパーゼの部分的なアミノ酸配列の決定により (Comménil *et al.*, 1999), それに対応する遺伝子 *lip1* がクローニングされ, 遺伝子破壊株が作出された (Reis *et al.*, 2005). 誘導条件下で細胞外リパーゼを産生しない *lip1* 欠失変異株が無傷葉へ感染可能であったことから, リパーゼは宿主表面への貫入に不可欠ではないことが示された.

クチン層への貫入

B. cinerea のクチナーゼは精製され, 18 kDa のタンパク質と同定されている. クチナーゼを抗原としたモノクローナル抗体を処理したガーベラの花弁を用いた接種試験で病斑形成が減少したことから, クチナーゼが本菌の宿主組織への侵入に重要な役割を果たしていることが示された (Salinas, 1992). 18 kDa クチナーゼをコードしている遺伝子 *cutA* がクローニングされ (van der Vlugt-Bergmans *et al.*, 1997), *cutA* のプロモーターに GUS 遺伝子をレポーターとして連結した発現解析が行われた. その結果, 高い GUS 活性が分生子の発芽時点と表皮細胞への侵入の間観察されている (van Kan *et al.*, 1997). 遺伝子破壊により *cutA* 遺伝子の機能を喪失した形質転換株が作出されたが, それらのガーベラ花弁とトマト果実への感染能力は野生株のそれと比較して変わるものではなかった. これらの結果はクチナーゼ A がクチクラ表面への侵入には不可欠ではないことを示すものである (van Kan *et al.*, 1997).

細胞壁への貫入

B. cinerea は多数の細胞壁分解酵素を分泌して細胞壁を破

壊し, それを養分として利用している. 表皮への侵入では, 酵素活性の結果として表皮細胞における細胞壁の膨張を伴うことがある (Mansfield and Richardson, 1981). 細胞壁のペクチン質に作用する酵素は組織の分解に重要な働きをしており, 病原性においても重要機能を果たしている (Clark and Lorbeer, 1976; Cole *et al.*, 1998; Collmer and Keen, 1986). エンドポリガラクトナーゼ活性は分生子の発芽以前に観察され (Verhoeff and Warren, 1972), 高い等電点を持つ 2 つのポリガラクトナーゼが感染過程の侵入段階に関与することが示されている (van den Heuvel and Waterreus, 1985). 構成酵素を早い段階から産生することにより宿主組織への速い侵入が可能になっているのかもしれない (Kapat *et al.*, 1998).

細胞死の誘導

クチクラ侵入の後, *B. cinerea* は侵入菌糸の伸展に先立って表皮細胞や葉肉細胞に壊死を誘導する (Clark and Lorbeer, 1976). *B. cinerea* によって分泌されるいくつかの代謝産物とタンパク質が植物組織に細胞死を引き起こすことが示されており, いくつかはプログラム細胞死 (PCD) を誘導する. PCD の誘導は本菌の感染を容易にし, また, 実際に感染の成功に不可欠な場合がある (Govrin and Levine, 2000).

毒素

B. cinerea の培養ろ液から植物に毒性を示すいくつかの二次代謝産物が同定されている. すなわち, 高度に置換されたラクトンのボトシノリド (Cutler *et al.*, 1993), 二環式セスキテルペンのボトリジアール (Colmenares *et al.*, 2002), ボトシノリドやボトリジアールと類縁の毒性の低い数種の化合物である (Colmenares *et al.*, 2002; Durán-Patrón *et al.*, 2000). ボトリジアールは感染組織で産生され (Deighton *et al.*, 2001), クロロシスと細胞の崩壊を誘導することが明らかとなっている (Colmenares *et al.*, 2002). ボトリジアールの特徴として興味深いのは, その毒性が光依存的なことである (Colmenares *et al.*, 2002). P450 モノオキシゲナーゼをコードしている *bcbot1* はボトリジアールの生合成に関与している. 異なる 3 菌株における *bcbot1* の欠失実験により, ボトリジアールの病原性への関与は菌株依存的であることが証明されている (Siewers *et al.*, 2005). *B. cinerea* はボトリジアールとその誘導体に加えてボトシニン酸とボトシニン関連物質といった植物に毒性を示す他の代謝産物も産生していることが報告されている (Reino *et al.*, 2004; Tani *et al.*, 2006).

シュウ酸

シュウ酸 (OA) は病原性において非常に多くの生理的役割を果たしている. OA は *B. cinerea* に近縁の *Sclerotinia*

Sclerotium の病原性において重要な役割を果たしていることが知られている。OA は低い pH でポリガラクトナーゼ活性を高めるとともに (Bateman and Beer, 1965), 植物の抵抗反応を阻害することが報告されている (Favaron *et al.*, 2004; Marciano *et al.*, 1983)。また, 植物のオキシダティブバーストの抑制 (Cessna *et al.*, 2000), pH シグナリングの媒介 (Rollins, 2003), PCD の誘導にも関与している (Kim *et al.*, 2008)。OA を産生しない *S. sclerotium* の変異株はシロイヌナズナを含む宿主植物に病原性を失うが, 接種液に OA を加えることで病原性を回復させることが可能であった (Dickman and Mitra, 1992; Godoy *et al.*, 1990)。*B. cinerea* も OA を培地 (Gentile, 1954) や感染した植物組織中に産生することが明らかとなっている (Verhoeff *et al.*, 1988)。OA の産生は周囲の pH によって調節されており, 周囲の pH が 5.0 を超すと検出されるようになる (Manteau *et al.*, 2003)。*B. cinerea* から分泌されるエンドポリガラクトナーゼ, アスパラギン酸プロテアーゼ, ラッカーゼといった病原性に関与する酵素の活性は OA の分泌による周囲の低い pH によって高められることが示されている (Manteau *et al.*, 2003; ten Have *et al.*, 2002)。

活性酸素種

活性酸素種 (ROS) の生成は植物と菌類の相互作用でおこる植物の抵抗反応に関与している。オキシダティブバーストは病原体感染後の初期に起こる一般的な応答である。植物による迅速な ROS の産生は当初, 防御遺伝子の発現と病原体から水や養分を制限する一種の PCD である過敏感反応 (HR) に必要なものとして認識された。*B. cinerea* のような殺生菌の場合, 植物細胞死は病原菌にとって有益となり, その後の発病に繋がる (Govrin and Levine, 2000)。感染過程において病斑中で増殖する菌糸体は ROS に直面している (Govin and Levine, 2000; Schouten *et al.*, 2002a)。*B. cinerea* 自身も ROS を生成し, いくつかの酵素は H_2O_2 の産生に関与することが考えられている。Cu-Zn スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 遺伝子とグルコースオキシダーゼ遺伝子がクローニングされ, 病原性への関与が調査された。その結果, SOD の欠失は顕著な病原性の低下をもたらしたが, 一方グルコースオキシダーゼ遺伝子の欠失は病原性に影響しなかった (Rolke *et al.*, 2004)。*B. cinerea* はクチャラ侵入の間 (Tenberge, 2004) と初期病斑形成に際して (Lyon *et al.*, 2004) 活発にオキシダティブバーストを引き起こすことが観察されている。ニコチン酸アデニンジヌクレオチド (NANPH) オキシダーゼは菌類においていろいろな分化の過程に関与している。Segmüller *et al.* (2008) は *B. cinerea* の NADPH オキシダーゼ (BcnoxA, B) の役割について調査し, それぞれの遺伝子の変異が病原性の低下を引き起こ

すことを明らかにした。すなわち, BcnoxB は侵入において重要な役割を果たし, 一方, BcnoxA は病斑の伸展に関与していた。両遺伝子の変異株はほぼ病原性を示さなくなった。植物の細胞死は *B. cinerea* の攻撃に対する宿主側の反応として起こるオキシダティブバーストによっても起こる (Govrin and Levine, 2000)。シロイヌナズナとタバコの研究から *B. cinerea* が完全に病原性を発揮するには HR が必要である可能性が示された (Dickman *et al.*, 2001; Govrin and Levine, 2000)。*B. cinerea* の病原性因子として初めて認識されたエンドポリガラクトナーゼ (BcPG1) は (ten Have *et al.*, 1998), ブドウで ROS の産生を含む防御反応を誘発し (Poinsot *et al.*, 2003; Vandelle *et al.*, 2006), キシラナーゼ Xyn11A もまた感染植物の細胞死を誘導することが知られている。キシラナーゼでは, 活性部位から離れた酵素表面にある 30 アミノ酸の領域が植物細胞への結合を媒介し, 細胞死誘導に関与することが明らかとなっている (Noda *et al.*, 2010)。*B. cinerea* が分泌するいくつかの代謝産物やタンパク質は植物組織に処理することで細胞死を誘導する。そして, ポトリジアル (Rossi *et al.*, 2011) や Nep1-like タンパク質 (Schouten *et al.*, 2008), セラトプラタニン (Frias *et al.*, 2011) などいくつかは HR 様の反応を誘導する。

宿主組織の菌体バイオマスへの転換

植物細胞壁の主要な機能は, 機械的強度と細胞間の接着である。植物細胞壁は主に多糖類からなる。すなわちヘミセルロースとペクチン質に埋め込まれたセルロースの繊維である。細胞から隣の細胞までには第一次細胞壁, ミドルラメラ層, そして第一次細胞壁の領域と識別することができ, ミドルラメラ層は高いペクチン含有量を示す。表皮細胞壁に侵入した病原菌は, その後ミドルラメラ層を伸張する。病原菌は細胞壁を破壊し, それを栄養源として利用するために多くの細胞壁分解酵素 (CWDEs) を分泌する。*B. cinerea* に関する多くの報告は CWDEs を取り上げたものであり, おそらくそれらは感染過程の全てのステップに関与している。

ペクチンメチルエステラーゼ

ペクチンメチルエステラーゼはホモガラクトナンにおけるメチル基の切断を触媒し, それによってポリガラクトナーゼとペクチンリアラーゼによって分解可能なペクチンを作る。Reignault *et al.* (1994) は pI7.1 と pI7.4 の異なる 2 つのペクチンメチルエステラーゼのアイソザイムを 42 kDa のタンパク質バンドから精製した。ペクチンメチルエステラーゼ活性はペクチン誘導剤によって誘導されず, カタボライト抑制を受けなかった。Bd90 を用いた遺伝子破壊実験

により、ペクチンメチルエステラーゼ遺伝子 *Bcpme1* は pI7.4 のアイソザイムをコードしていることが示され、*Bcpme1* の破壊株では酵素活性が 75% 減少することが明らかとなった。さらに、その変異株ではリンゴ果実、ブドウ、シロイヌナズナに対する病原性の低下が確認されている (Valette-Collet *et al.*, 2003)。しかしながら、異なる菌株の B05.10 では、同じ *Bcpme1* を含む 2 つの *Bcpme* 遺伝子の 1 つあるいは両方の変異株において高度にメチル化されたペクチンでの増殖に影響は見られず、また病原性の低下もみられなかった。このことから *B. cinerea* の B05.10 ではペクチンメチルエステラーゼなしにペクチンを分解できると結論づけられた (Kars *et al.*, 2005b)。

エンドポリガラクトツロナーゼ

エンドポリガラクトツロナーゼはエンド型の酵素で、 α -1,4 結合したポリガラクトン酸の加水分解を触媒する。1990 年代後期に *B. cinerea* で最初のポリガラクトツロナーゼ (BcPG) をコードしている遺伝子がクローニングされているが、*B. cinerea* のゲノム上には少なくとも 6 つの *Bcpg* 遺伝子が存在していることが報告されている (Wubben *et al.*, 1999)。ten Have *et al.* (2001) によってトマト、ソラマメ、リンゴ、ズッキーニの 4 種の宿主植物上での *Bcpg1* から *Bcpg6* の異なる 6 つの遺伝子の発現が調査された。その結果、*Bcpg* 遺伝子の発現パターンは、それらが感染のステージと宿主によって異なることが明らかとなった。*Bcpg1* が供試した全ての植物組織で発現したのに対し、*Bcpg3* と *Bcpg5* はリンゴ組織だけで発現した。一方、*Bcpg2* の発現はリンゴ果実を除く全ての植物で感染初期に検出された。*Bcpg* 遺伝子の利用は病原性における個々のアイソザイムの機能を解析することを容易にした。*Bcpg1* の破壊はトマトの葉および果実ならびにリンゴに対する病原性の低下をもたらした (ten Have *et al.*, 1998)。*Bcpg2* の欠失はトマトとソラマメに対する病原性に強く影響し、初期病斑形成の遅れ、病斑の伸展率の 50 から 80% までの低下をもたらした。これらのデータは BcPG2 が *B. cinerea* の病原性に重要であることを示唆している (Kars *et al.*, 2005a)。

エキソポリガラクトツロナーゼ

Johnston and Williamson (1992) は初めて *B. cinerea* から 65 kDa と 70 kDa の 2 つのエキソポリガラクトツロナーゼを精製した。2 つのエキソポリガラクトツロナーゼはカンキツペクチンを炭素源とした *B. cinerea* の培養液から検出された。そしてそれらは *in vitro* でポリガラクトン酸ならびにそのモノマーのガラクトン酸によって誘導されることが示された。免疫組織化学的な解析から、菌糸から分泌されたエキソポリガラクトツロナーゼはキュウリ葉で分生子接種 9 時間

後に検出されている (Rha *et al.*, 2001)。Tobias *et al.* (1993) はリンゴのペクチンで培養した *B. cinerea* の培養液からエキソポリガラクトツロナーゼの 4 つのアイソザイムを検出している。

セルラーゼ

セルラーゼはセルロースの β -1,4 グリコシド結合の分解を触媒する。*B. cinerea* は液体培地中に一つの細胞外 β -グリコシダーゼ (Sasaki and Nagayama, 1994) と 3 つの細胞内グリコシダーゼ (Gueguen *et al.*, 1995) を産生することが報告されている。細胞外 β -グリコシダーゼと細胞内 β -グリコシダーゼの一つが精製され、細胞外 β -グリコシダーゼのみが細胞壁の分解に関与していることが示唆された (Sasaki and Nagayama, 1996)。Espino *et al.* (2005) によって *cel5A* がコードするエンド- β -1,4-グルカナーゼが単離され、*cel5A* 遺伝子発現と細胞外 β -1,4-グルカナーゼ活性のレベルが同様に炭素源によって制御されていることが示された。すなわち、両者はカルボキシメチルセルロースによって誘導され、グルコースによって抑制された。また、*cel5A* の mRNA はトマト葉への感染の間に検出することが可能であった。*cel5A* の遺伝子破壊株では細胞外 β -1,4-グルカナーゼ活性の顕著な低下はみられず、トマト葉またはカーベラ花卉に野生株と同様の病原性を示した (Espino *et al.*, 2005)。

キシラナーゼ

エンド- β -1,4-キシラナーゼは植物細胞壁の主要なヘミセルロース成分を作るキシランの β -1,4 結合した多糖類骨格を加水分解する。Urbanek and Zalewska-Sobczak (1984) は *B. cinerea* がリンゴ細胞壁を分解している間、3 つのキシラナーゼを分泌することを報告した。Brito *et al.* (2006) はエンド- β -1,4-キシラナーゼをコードする *xyn11A* を単離し、それがキシランによって誘導、グルコースによって抑制され、植物体上で発現することを明らかにした。*xyn11A* の変異による病原性への影響は強く、平均病斑サイズを 70% 以上減少させたことから、*Xyn11A* は *B. cinerea* の完全な病原性に必要であることが示唆された。さらに、*xyn11A* 変異株にキシラナーゼ活性を失った *xyn11A* 変異遺伝子の導入が、野生の *xyn11A* の導入と同じように弱い病原性を野生株の病原性に回復させたことから *Xyn11A* のキシラン加水分解活性は感染過程に関与しないことが証明された (Noda *et al.*, 2010)。

アスパラギン酸プロテアーゼ

Movahedi and Heale (1990a) は *B. cinerea* が液体培地および感染したニンジン組織においてアスパラギン酸プロテアーゼ (AP) を産生することを明らかにした。AP 活性はペクチナーゼ活性の現れる前の分生子発芽時と同様に未発芽の分生子からも検出された。接種液に AP の特異的阻害

剤であるペプスタチンを加えた場合、AP活性はブロックされ、感染は強く低下した。これらの結果はAPの病原性への関与の可能性を示唆するものであった (Movahedi and Heale, 1990b)。しかしながら、トマトのAPは傷によって葉で全身的に誘導されることが示されており (Schaller and Ryan, 1996)、そして *B. cinerea* 感染はトマトの傷によるシグナル応答を誘導した (Diaz *et al.*, 2002) ことから、この研究では病原体とホストに由来するプロテアーゼの区別はできなかった。 *B. cinerea* から5つのAPをコードしている遺伝子がクローニングされ *Bcap1* から *Bcap5* と表された。BcAP2は液胞APで、BcAP1とBcAP5は分泌されるAPと考えられた。BcAP3とBcAP4はグリコシルフォスファチジルイノシトールアンカーによって原形質膜に結合していることが予測された。全ては *in vitro* と *in planta* で発現していることが示された (ten Have *et al.*, 2004)。 *B. cinerea* ゲノムの解析により更に9つの *Bcap* 遺伝子の存在が明らかとなり、それらは *Bccp6* から *Bccp14* と表された。 *Bcap8* 欠失変異株では分泌されるAPの活性が70から80%低下したが、野生株と変わらない病原性を示したことが報告されている (ten Have *et al.*, 2010)。

ラッカーゼ

ラッカーゼは *o*-, *p*-ジフェノール、ポリフェノール、アミノフェノール、芳香族あるいは脂肪族アミンの O_2 による酸化を触媒する青色銅オキシダーゼの一種である (Riva, 2006)。ククルビタシンとして知られるウリ科の二次代謝産物はキュウリ果実とキャベツの葉を *B. cinerea* 感染から保護する (Bar-Nun and Mayer, 1990)。 *B. cinerea* の培養物に含まれるラッカーゼ活性はククルビタシンによって抑制され、一方、他の酵素は影響を受けなかった (Viterbo *et al.*, 1992) ことから、ラッカーゼは病原性に重要な役割を演じているという仮説に至っている (Staples and Mayer, 1995; Viterbo *et al.*, 1992)。ククルビタシンはmRNAレベルの抑制 (Gonen *et al.*, 1996) によりラッカーゼ活性の低下を引き起こすことが示されている (Viterbo *et al.*, 1994)。 *B. cinerea* の3つのラッカーゼ遺伝子 *Bclcc1*, *Bclcc2*, *Bclcc3* が特徴付けられ、 *Bclcc2* のみがレスベラトロールまたはタンニンの存在下の液体培養で強く発現することが確認されている。ブドウの二次代謝産物であるレスベラトロールは *B. cinerea* の感染から植物を守るファイトアレキシンと考えられており、菌類のラッカーゼ活性はレスベラトロールを解毒してブドウでのコロニー形成を容易にすると仮定された。 *Bclcc2* を置換した変異株はレスベラトロールもタンニンも変換することができなかった。レスベラトロールに接触して生育した場合、野生株と *Bclcc1* 置換変異株は生育抑制を示したが、 *Bclcc2* 置

換変異株は影響を受けなかったことから、BcLCC2はレスベラトロールを解毒しないで、むしろ菌にとってより有毒な化合物に変換していることが示された (Schouten *et al.*, 2002b)。

宿主抵抗反応の克服

B. cinerea の感染はファイトアレキシンの生合成 (Bennett *et al.*, 1994; Kliebenstein *et al.*, 2005; Mansfield *et al.*, 1980; van Baarlen *et al.*, 2007) と病原性関連タンパク質の蓄積 (Benito *et al.*, 1998; Diaz *et al.*, 2002; Ferrari *et al.*, 2003) を誘導する。これらの防御反応はおそらく局部的で感染部位に限られている。防御応答の範囲は病原菌が効果的に制限される一次壊死病斑に終わり、その一次病斑の一部はやがて病原力の強い伸展性の病斑に発展する (Benito *et al.*, 1998)。シロイヌナズナはファイトアレキシンのカマレキシンを産生することが知られている。カマレキシンの産生能に欠陥が見られるシロイヌナズナの変異体を用いた研究から、カマレキシンは本菌に対する抵抗性に働いていることが明らかとなった。カマレキシン処理は菌類にアポトーシス様のPCDを誘導し、抗アポトーシス能を強化した *B. cinerea* の形質転換株ではカマレキシン感受性は弱まることが示された (Shlezinger *et al.*, 2011a)。カマレキシンはPCDを誘導して感染初期のステージの間病斑の広がりを制限しているのかもしれない。それに対して菌類の抗アポトーシス機構が *B. cinerea* を回復させ、その後感染を確立させるのかもしれない (Shlezinger *et al.*, 2011a, b)。さらに、 *B. cinerea* はファイトアレキシンや殺菌剤に対する感受性を低下させるのに関与するATP-binding cassette (ABC) トランスポーターを持っている (Hayashi *et al.*, 2002; Nakajima *et al.*, 2001; Schoonbeek *et al.*, 2002; Vermeulen *et al.*, 2001)。また、カマレキシンに対する防御機構として働くABCトランスポーターであるBcAtRBの発現は本菌がカマレキシンに接触することで誘導されることが明らかとなっている (Stefanato *et al.*, 2009)。我々はトマトを含むいくつかの宿主植物に病原性を失った子のう胞子由来株を分離している。トマト葉を用いた接種試験において、非病原性株の侵入菌糸がトマト組織の過敏感反応に似た壊死によって抑制されていることが観察された。活性酸素種の産生が植物と病原体との相互作用で最も初期の防御反応の一つであることから、DAB染色法により接種部位での H_2O_2 蓄積を調査した。その結果、非病原性株の侵入した表皮細胞で H_2O_2 の蓄積が確認され、非病原性株の生長率は野生株と比較して、 H_2O_2 濃度の増加に伴って著しく減少することも確認された (未発表データ)。

まとめ

B. cinerea は広範囲な宿主植物への感染を可能にするための多数の酵素と代謝産物を作り出す。これらの合成物の各々は感染過程の異なる時期で役割を果たしているかもしれない。これに加えて、植物の防御を克服する能力はこの菌の病原性に貢献している。遺伝子破壊株の作出は特定の遺伝子産物の役割を研究するための強力な研究ツールであり、*B. cinerea* においても遺伝子破壊実験によって多くの遺伝子の機能が解析されている。しかしながら、大部分のノックアウト変異株で病原性における明らかな変化は確認されていない。異なる種類の病原性因子の間でオーバーラップがあり、アイソザイムファミリーの中の重複性があるからである。これに加えて、病原性因子の菌株依存性が報告されている。ペクチンメチルエステラーゼ遺伝子 (*bcpme1*) の欠失は菌株 Bd90 では病原性の低下を引き起こしたが (Valette-Collet *et al.*, 2003), 菌株 B05.10 では病原性に変化は見られなかった (Kars *et al.*, 2005b)。感染過程における異なる病原性因子の複雑な役割をより良く理解するには、異なる圃場分離株から多重遺伝子破壊株を作出することが必要であろう。

引用文献

- Bar-Nun, N. and Mayer, A.M. (1990). Cucurbitacins protect cucumber tissue against infection by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 29: 787–791.
- Bateman, D.F. and Beer, S.V. (1965). Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 55: 204–211.
- Benito, E.P., ten Have, A., van't Klooster, J.W. and van Kan, J.A.L. (1998). Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *Euro. J. Plant Pathol.* 104: 207–220.
- Bennett, M.H., Gallagher, M.D.H., Bestwick, C.S., Rossiter, J.T. and Mansfield, J.W. (1994). The phytoalexin response of lettuce to challenge by *Botrytis cinerea*, *Bremia lactucae* and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 44: 321–333.
- Brito, N., Espino, J.J. and Gonzalez, C. (2006). The endo-beta-1,4-xylanase xyn11A is required for virulence in *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19: 25–32.
- Cessna, S.G., Sears, V.E., Dickman, M.B. and Low, P.S. (2000). Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *Plant Cell* 12: 2191–2200.
- Clark, C.A. and Lorbeer, J.W. (1976). Comparative histopathology of *Botrytis squamosa* and *B. cinerea* on onion leaves. *Phytopathology* 66: 1279–1289.
- Cole, L., Dewey, F.M. and Hawes, C.R. (1996). Infection mechanisms of *Botrytis* species: pre-penetration and pre-infection processes of dry and wet conidia. *Mycol. Res.* 100: 277–286.
- Cole, L., Dewey, F.M. and Hawes, C.R. (1998). Immunocytochemical studies of the infection mechanisms of *Botrytis fabae* II. Host cell wall breakdown. *New Phytol.* 139: 611–622.
- Collmer, A. and Keen, N.T. (1986). The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24: 383–409.
- Colmenares, A.J., Aleu, J., Durán-Patrón, R., Collado, I.G. and Hernández-Galán, R. (2002). The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*. *J. Chem. Ecol.* 28: 997–1005.
- Comménil, P., Belingheri, L., Sancholle, M. and Dehorter, B. (1995). Purification and properties of an extracellular lipase from the fungus *Botrytis cinerea*. *Lipids* 30: 351–356.
- Comménil, P., Belingheri, L. and Dehorter, B. (1998). Antilipase antibodies prevent infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 52: 1–14.
- Comménil, P., Belingheri, L., Bauw, G. and Dehorter, B. (1999). Molecular characterization of a lipase induced in *Botrytis cinerea* by components of grape berry cuticle. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55: 37–43.
- Cutler, H.G., Jacyno, J.M., Harwood, J.S., Dulik, D., Goodrich, P.D. and Roberts, R.G. (1993). Botcinolide: a biologically active natural product from *Botrytis cinerea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57: 1980–1982.
- Deighton, N., Muckenshabel, I., Colmenares, A.J., Collado, I.G. and Williamson, B. (2001). Botrydial is produced in plant tissues infected by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 57: 689–692.
- Diaz, J., ten Have, A. and van Kan, J.A.L. (2002). The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 129: 1341–1351.
- Dickman, M.B. and Mitra, A. (1992). *Arabidopsis thaliana* as a model for studying *Sclerotinia sclerotiorum* pathogenesis. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41: 255–263.
- Dickman, M.B., Park, Y.K., Oltersdorf, T., Li, W., Clemente, T. and French, R. (2001). Abrogation of disease development in plants expressing animal apoptotic genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98: 6957–6962.
- Durán-Patrón, R., Hernández-Galán, R. and Collado, I.G. (2000). Secobotrytriendiol and related sesquiterpenoids: new phytotoxic metabolites from *Botrytis cinerea*. *J. Nat. Prod.* 63: 182–184.
- Espino, J.J., Brito, N., Noda, J. and González, C. (2005). *Botrytis cinerea* endo-β-1,4-glucanase Cel5A is expressed during infection but is not required for pathogenesis. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 66: 213–221.
- Favaron, F., Sella, L. and D'Ovidio, R. (2004). Relationships among endopolygalacturonase, oxalate, pH, and plant polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in the interaction between *Sclerotinia sclerotiorum* and soybean. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17: 1402–1409.
- Ferrari, S., Plotnikova, J.M., De Lorenzo, G. and Ausubel, F.M. (2003). *Arabidopsis* local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires *EDS4* and *PAD2*, but not *SID2*, *EDS5* or *PAD4*. *Plant J.* 35: 193–205.
- Frias, M., González, C. and Brito, N. (2011). BcSpl1, a ceratoplatenin family protein, contributes to *Botrytis cinerea* viru-

- lence and elicits the hypersensitive response in the host. *New Phytol.* 192: 483–495.
- Gentile, A.C. (1954). Carbohydrate metabolism and oxalic acid synthesis by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 29: 257–261.
- Godoy, G., Steadman, J.R., Dickman, M.B. and Dam, R. (1990). Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 37: 179–191.
- Gonen, L., Viterbo, A., Cantone, F., Staples, R.C. and Mayer, A.M. (1996). Effect of cucurbitacins on mRNA coding for laccase in *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 42: 321–324.
- Govrin, E.M. and Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.* 10: 751–757.
- Gueguen, Y., Chemardin, P., Arnaud, A. and Galzy, P. (1995). Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Botrytis cinerea*. *Enzyme Microb. Technol.* 17: 900–906.
- Hayashi, K., Schoonbeek, H. and De Waard, M.A. (2002). Expression of the ABC transporter BcatrD from *Botrytis cinerea* reduces sensitivity to sterol demethylation inhibitor fungicides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 73: 110–121.
- Johnston, D.J. and Williamson, B. (1992). Purification and characterization of four polygalacturonases from *Botrytis cinerea*. *Mycol. Res.* 96: 343–349.
- Kapat, A., Zimand, G. and Elad, Y. (1998). Biosynthesis of pathogenicity hydrolytic enzymes by *Botrytis cinerea* during infection of bean leaves and in vitro. *Mycol. Res.* 102: 1017–1024.
- Kars, I., Krooshof, G.H., Wagemakers, L., Joosten, R., Benen, J.A.E. and van Kan, J.A.L. (2005a). Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *Plant J.* 43: 213–225.
- Kars, I., Wagemakers, C.A.M., McCalman, M. and van Kan, J.A.L. (2005b). Functional analysis of *Botrytis cinerea* pectin methyl-esterase genes by PCR-based targeted mutagenesis: *Bcpme1* and *Bcpme2* are dispensable for virulence of strain B05.10. *Mol. Plant Pathol.* 6: 641–652.
- Kerssies, A. and Frinking, H.D. (1996). Relations between glass-house climate and dry weight of petals, epicuticular wax, cuticle, pre-harvest flowering period and susceptibility to *Botrytis cinerea* of gerbera and rose flowers. *Eur. J. Plant Pathol.* 102: 257–263.
- Kim, K.S., Min, J.Y. and Dickman, M.B. (2008). Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21: 605–612.
- Kliebenstein, D.J., Rowe, H.C. and Denby, K.J. (2005). Secondary metabolites influence Arabidopsis/*Botrytis* interactions: variation in host production and pathogen sensitivity. *Plant J.* 44: 25–36.
- Lyon, G.D., Goodman, B.A. and Williamson, B. (2004). *Botrytis cinerea* perturbs redox processes as an attack strategy in plants: *Botrytis*. In *Biology, Pathology and Control* (Elad Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N., eds.). pp. 119–141, Kluwer, Dordrecht, Netherlands.
- Mansfield, J.W., Porter, A.E.A. and Smallman, R.V. (1980). Dihydroxyerone derivatives as components of the furanoacetylenic phytoalexin response of tissues of *Vicia faba*. *Phytochemistry* 19: 1057–1061.
- Mansfield, J.W. and Richardson, A. (1981). The ultrastructure of interactions between *Botrytis* species and broad bean leaves. *Physiol. Plant Pathol.* 19: 41–48.
- Manteau, S., Aboune, S., Lambert, B. and Legendre, L. (2003). Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43: 359–366.
- Marciano, P., Di Lenna, P. and Magro, P. (1983). Oxalic acid, cell wall-degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower. *Physiol. Plant Pathol.* 22: 339–345.
- Movahedi, S. and Heale, J.B. (1990a). Purification and characterization of an aspartic proteinase secreted by *Botrytis cinerea* Pers ex. Pers in culture and in infected carrots. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36: 289–302.
- Movahedi, S. and Heale, J.B. (1990b). The roles of aspartic proteinase and endo-pectin lyase enzymes in the primary stages of infection and pathogenesis of various host tissues by different isolates of *Botrytis cinerea* Pers ex. Pers. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36: 303–324.
- Nakajima, M., Suzuki, J., Hosaka, T., Hibi, T. and Akutsu, K. (2001). Functional analysis of an ATP-binding cassette transporter gene in *Botrytis cinerea* by gene disruption. *J. Gen. Plant Pathol.* 67: 212–214.
- Noda, J., Brito, N. and Gonzalez, C. (2010). The *Botrytis cinerea* xylanase Xyn11A contributes to virulence with its necrotizing activity, not with its catalytic activity. *BMC Plant Biol.* 10: 38.
- Poinssot, B., Vandelle, E., Bentéjac, M., Adrian, M., Levis, C., Brygoo, Y., Garin, J., Sicilia, F., Coutos-Thévenot, P. and Pugin, A. (2003). The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16: 553–564.
- Reignault, P., Mercier, M., Bompeix, G. and Boccara, M. (1994). Pectin methyl-esterase from *Botrytis cinerea*: physiological, biochemical and immunochemical studies. *Microbiology* 140: 3249–3255.
- Reino, J.L., Hernández-Galán, R., Durán-Patrón, R. and Collado, I.G. (2004). Virulence-toxin production relationship in isolates of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *J. Phytopathol.* 152: 563–566.
- Reis, H., Pffiff, S. and Hahn, M. (2005). Molecular and functional characterization of a secreted lipase from *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* 6: 257–267.
- Rha, E., Park, H.J., Kim, M.O., Chung, Y.R., Lee, C.W. and Kim, J.W. (2001). Expression of exopolygalacturonases in *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol. Lett.* 201: 105–109.
- Riva, S. (2006). Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol.* 24: 219–226.
- Rolke, Y., Liu, S., Quidde, T., Williamson, B., Schouten, A., Weltring, K.-M., Siewers, V., Tenberge, K.B., Tudzynski, B. and Tudzynski, P. (2004). Functional analysis of H₂O₂-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Mol. Plant Pathol.* 5: 17–27.
- Rollins, J.A. (2003). The *Sclerotinia sclerotiorum pac1* gene is

- required for sclerotial development and virulence. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16: 785–795.
- Rossi, F.R., Gárriz, A., Marina, M., Romero, F.M., Gonzalez, M.E., Collado, I.G. and Pieckenstein, F.L. (2011). The sesquiterpene botrydial produced by *Botrytis cinerea* induces the hypersensitive response on plant tissues and its action is modulated by salicylic acid and jasmonic acid signaling. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24: 888–896.
- Salinas, J. (1992). Function of cutinolytic enzymes in the infection of gerbera flowers by *Botrytis cinerea*. Ph.D. dissertation, University of Utrecht, Netherlands.
- Salinas, J. and Verhoeff, K. (1995). Microscopical studies of the infection of gerbera flowers by *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 101: 377–386.
- Sasaki, I. and Nagayama, H. (1994). β -glucosidase from *Botrytis cinerea*: Its relation to the pathogenicity of this fungus. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58: 616–620.
- Sasaki, I. and Nagayama, H. (1996). β -glucosidase of *Botrytis cinerea*: Its involvement in the pathogenicity of this fungus. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60: 54–56.
- Schaller, A. and Ryan, C.A. (1996). Molecular cloning of a tomato leaf cDNA encoding an aspartic protease, a systemic wound response protein. *Plant Mol. Biol.* 31: 1073–1077.
- Schoonbeek, H., Raaijmakers, J.M. and De Waard, M.A. (2002). Fungal ABC transporters and microbial interactions in natural environments. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15: 1165–1172.
- Schouten, A., Tenberge, K.B., Vermeer, J., Stewart, J., Wagemakers, L., Williamson, B. and van Kan, J.A.L. (2002a). Functional analysis of an extracellular catalase of *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* 3: 227–238.
- Schouten, A., Wagemakers, L., Stefanato, F.L., van der Kaaij, R.M. and van Kan, J.A.L. (2002b). Resveratrol acts as a natural antifungicide and induces self-intoxication by a specific laccase. *Mol. Microbiol.* 43: 883–894.
- Schouten, A., van Baarlen, P. and van Kan, J.A.L. (2008). Phytotoxic Nep1-like proteins from the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* associate with membranes and the nucleus of plant cells. *New Phytol.* 177: 493–505.
- Segmüller, N., Kokkelink, L., Giesbert, S., Odinius, D., van Kan, J. and Tudzynski, P. (2008). NADPH oxidases are involved in differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21: 808–819.
- Shlezinger, N., Doron, A. and Sharon, A. (2011a). Apoptosis-like programmed cell death in the grey mould fungus *Botrytis cinerea*: genes and their role in pathogenicity. *Biochem. Soc. Trans.* 39: 1493–1498.
- Shlezinger, N., Minz, A., Gur, Y., Hatam, I., Dagdas, Y.F., Talbot, N.J. and Sharon, A. (2011b). Anti-apoptotic machinery protects the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* from host-induced apoptotic-like cell death during plant infection. *PLoS Pathog.* 7: e1002185.
- Siewers, V., Viaud, M., Jimenez-Teja, D., Collado, I.G., Gronover, C.S., Pradier, J.M., Tudzynski, B. and Tudzynski, P. (2005). Functional analysis of the cytochrome P450 monooxygenase gene *bcbot1* of *Botrytis cinerea* indicates that botrydial is a strain-specific virulence factor. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18: 602–612.
- Staples, R.C. and Mayer, A.M. (1995). Putative virulence factors of *Botrytis cinerea* acting as a wound pathogen. *FEMS Microbiol. Lett.* 134: 1–7.
- Stefanato, F.L., Abou-Mansour, E., Buchala, A., Kretschmer, M., Mosbach, A., Hahn, M., Bochet, C.G., Métraux, J.-P. and Schoonbeek, H. (2009). The ABC transporter BcatrB from *Botrytis cinerea* exports camalexin and is a virulence factor on *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 58: 499–510.
- Sutton, J.C., Rowell, P.M. and James, T.D.W. (1984). Effects of leaf wax, wetness duration and temperature on infection of onion leaves by *Botrytis squamosa*. *Phytoprotection* 65: 65–68.
- Tani, H., Koshino, H., Sakuno, E., Cutler, H.G. and Nakajima, H. (2006). Botcinins E and F and botcinolide from *Botrytis cinerea* and structural revision of botcinolides. *J. Nat. Prod.* 69: 722–725.
- ten Have, A., Mulder, W., Visser, J. and van Kan, J.A.L. (1998). The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 1009–1016.
- ten Have, A., Oude Breuil, W., Wubben, J.P., Visser, J. and van Kan, J.A.L. (2001). *Botrytis cinerea* endopolygalacturonase genes are differentially expressed in various plant tissues. *Fungal Genet. Biol.* 33: 97–105.
- ten Have, A., Tenberge, K.B., Benen, J.A.E., Tudzynski, P., Visser, J. and van Kan, J.A.L. (2002). The contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of fungal plant pathogens: The Mycota, a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research. XI. *In Agricultural Applications* (Kempken, F., ed.). pp. 341–358, Springer-Verlag, Berlin.
- ten Have, A., Dekkers, E., Kay, J., Phylip, L.H. and van Kan, J.A.L. (2004). An aspartic proteinase gene family in the filamentous fungus *Botrytis cinerea* contains members with novel features. *Microbiology* 150: 2475–2489.
- ten Have, A., Espino, J.J., Dekkers, E., Van Sluyter, S.C., Brito, N., Kay, J., González, C. and van Kan, J.A.L. (2010). The *Botrytis cinerea* aspartic proteinase family. *Fungal Genet. Biol.* 47: 53–65.
- Tenberge, K.B. (2004). Morphology and cellular organization in *Botrytis* interactions with plants. *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N., eds.). pp. 67–84, Kluwer, Dordrecht, Netherlands.
- Tobias, R.B., Conway, W. and Sams, C. (1993). Polygalacturonase isozymes from *Botrytis cinerea* grown on apple pectin. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 30: 829–837.
- Urbanek, H. and Zalewska-Sobczak, J. (1984). Multiplicity of cell wall degrading glycosidic hydrolases produced by apple infecting *Botrytis cinerea*. *J. Phytopathol.* 110: 261–271.
- Valette-Collet, O., Cimerman, A., Reinault, P., Levis, C. and Boccara, M. (2003). Disruption of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase gene *Bcyme1* reduces virulence on several host plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16: 360–367.
- van Baarlen, P., Woltering, E.J., Staats, M. and van Kan, J.A.L. (2007). Histochemical and genetic analysis of host and non-host interactions of *Arabidopsis* with three *Botrytis* species: an important role for cell death control. *Mol. Plant Pathol.* 8: 41–54.
- van den Heuvel, J. and Waterreus, L.P. (1985). Pectic enzymes

- associated with phosphate-stimulated infection of French bean leaves by *Botrytis cinerea*. Neth. J. Plant Pathol. 91: 253–264.
- van der Vlugt-Bergmans, C.J.B., Wagemakers, C.A.M. and van Kan, J.A.L. (1997). Cloning and expression of the cutinase A gene of *Botrytis cinerea*. Mol. Plant-Microbe Interact. 10: 21–29.
- van Kan, J.A.L., van't Klooster, J.W., Wagemakers, C.A.M., Dees, D.C.T. and van der Vlugt-Bergmans, C.J.B. (1997). Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of gerbera and tomato. Mol. Plant-Microbe Interact. 10: 30–38.
- Vandelle, E., Poinssot, B., Wendehenne, D., Bentejac, M. and Alain, P. (2006). Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses. Mol. Plant-Microbe Interact. 19: 429–440.
- Verhoeff, K. and Warren, J.M. (1972). In vitro and in vivo production of cell wall degrading enzymes by *Botrytis cinerea* from tomato. Neth. J. Plant Pathol. 78: 179–185.
- Verhoeff, K., Leeman, M., van Peer, R., Posthuma, L., Schot, N. and van Eijk, G.W. (1988). Changes in pH and the production of organic acids during colonization of tomato petioles by *Botrytis cinerea*. J. Phytopathol. 122: 327–336.
- Vermeulen, T., Schoonbeek, H. and De Waard, M.A. (2001). The ABC transporter BcatrB from *Botrytis cinerea* is a determinant of the activity of the phenylpyrrole fungicide fludioxonil. Pest Manag. Sci. 57: 393–402.
- Viterbo, A., Yagen, B. and Mayer, A.M. (1992). Cucurbitacins, 'attack' enzymes and laccase in *Botrytis cinerea*. Phytochemistry 32: 61–65.
- Viterbo, A., Staples, R.C., Yagen, B. and Mayer, A.M. (1994). Selective mode of action of cucurbitacin in the inhibition of laccase formation in *Botrytis cinerea*. Phytochemistry 35: 1137–1142.
- Williamson, B., Duncan, G.H., Harrison, J.G., Harding, L.A., Elad, Y. and Zimand, G. (1995). Effect of humidity on infection of rose petals by dry-inoculated conidia of *Botrytis cinerea*. Mycol. Res. 99: 1303–1310.
- Wubben, J.P., Mulder, W., ten Have, A., van Kan, J.A.L. and Visser, J. (1999). Cloning and partial characterization of endopolygalacturonase genes from *Botrytis cinerea*. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1596–1602.