



Genetica, evolutie en mechanismen van niet-waardresistentie

Hossein Jafary

Op 8 december 2006 promoveerde Hossein Jafary aan Wageningen Universiteit op het proefschrift getiteld 'Barley-Puccinia rusts: a model system to study the genetics, evolution and mechanisms of nonhost immunity in plants'. Promotor was Prof. Dr. R.G.F. Visser, hoogleraar Plantenveredeling, co-promotor was Dr.Ir. R.E. Niks, beiden verbonden aan de leerstoelgroep Plantenveredeling van Wageningen Universiteit. De promotiestudie werd mogelijk gemaakt door een beurs van de Agricultural Research and Education Organization (AREO) van Iran.

Inleiding

De genetische basis van niet-waardresistentie van planten tegen plantpathogenen is erg lastig te onderzoeken omdat er, per definitie, interspecifieke kruisingen tussen een vatbare waardsoort en een resistente niet-waardsoort voor nodig zijn. Het gerst-*Puccinia* roest modelstelsel maakte het mogelijk het aantal genen dat betrokken is bij niet-waardresistentie te bepalen, almede hun specificiteit en diversiteit. Eerst werd een gerstlijn, SusPtrit, ontwikkeld met een uitzonderlijke vatbaarheid voor verscheidene soorten en vormen van roestschimmels die tarwe, kweekgras en andere grassen aantasten. De overgrote meerderheid van gerstgeno-

typen is volledig resistent tegen deze zogenaamde heterologe roestschimmels. SusPtrit werd gekruist met gewone, resistente, gerstlijnen om de overerving te bestuderen van de (bijna) niet-waardresistentie. De resistentie berustte op een kwantitatieve overerving, waarvoor een QTL (*quantitative trait loci*) -analyse geëigend is. In tegenstelling tot wat verwacht zou kunnen worden, berustte de niet-waardresistentie van gerst tegen de verschillende roestschimmelsoorten niet op enkele sleutelgenen die effectief waren tegen alle heterologe roesten, maar op verschillende genen met meestal een hoge mate van roestsoort-specificiteit.

Accumulatie van genen voor vatbaarheid tegen roestsoorten waarvoor gerst een onvolledige niet-waardstatus heeft

Een serie van 109 gerstlijnen werd in het zaailingstadium getoetst op resistentie tegen roestschimmels. Daaruit blijkt dat gerst een volledige niet-waardstatus heeft voor de meeste heterologe roestschimmels, maar een onvolledige ('bijna') niet-waardstatus heeft voor de roestschimmels *P. triticina*, *P. persistens*, *P. hordei-murini*, *P. hordei-secalini*, *P. graminis* f. sp. *lolii* en *P. coronata* ff. spp. *avenae* en *holci*. Geen van de gerstlijnen was echter volledig vatbaar voor

één of meer van deze heterologe roestschimmels. Uit het voorkomen van differentiële interactie tussen gerstlijnen en heterologe roestschimmels bleek dat de resistentie erg roestsoort-specifiek kon zijn. Enkele gerstlijnen waren enigszins vatbaar voor verschillende heterologe roestsoorten, wat suggereert dat er ook resistentiegenen voorkomen die effectief zijn tegen meerdere roestschimmelsoorten. Door kruisen en selecteren werden genen voor vatbaarheid tegen *P. triticina* en *P. hordei-murini* samengebracht in twee gerstlijnen, respectievelijk SusPtrit en SusPmur. In het zaailingstadium zijn deze beide lijnen even vatbaar als de normale waardsoort voor deze roestschimmels. De beide lijnen bleken ook erg vatbaar voor een aantal andere heterologe roestschimmelsoorten.

Niet-waardresistentie in gerst tegen heterologe roesten berust op sets van resistentiegenen met verschillende en overlappende specificiteit

Het ras Vada is volledig resistent tegen heterologe roesten, zoals elk modern gerstras. Een recombinante inteeltlijn (RIL) -populatie afkomstig van de kruising Vada x SusPtrit (152 lijnen in F₂) werd geïnoculeerd met acht roestisolaten die tot vijf heterologe en twee heterologe (d.w.z. gerst is waard-

PROMOTIES



soort) roestschimmelsoorten behoren. De resistentie tegen al deze roestisolaten bleek kwantitatief over te erven. Een QTL-analyse identificeerde achttien chromosoomsegmenten met daarop genen die een rol speelden in de resistentie. Elf hiervan waren effectief tegen slechts één roestschimmelsoort, en zeven segmenten bleken een rol te spelen in resistentie tegen twee of meer roestschimmelsoorten. Dat laatste wijst op een gen met een minder roestspecifiek effect, of op koppeling van twee of meer roestspecifieke genen. Eén *R*-gen voor overgevoelighedsresistentie tegen *P. hordei-secalini* werd ontdekt.

Analyse van de basenvolgorde van het ITS (internal transcribed spacers) -DNA van de

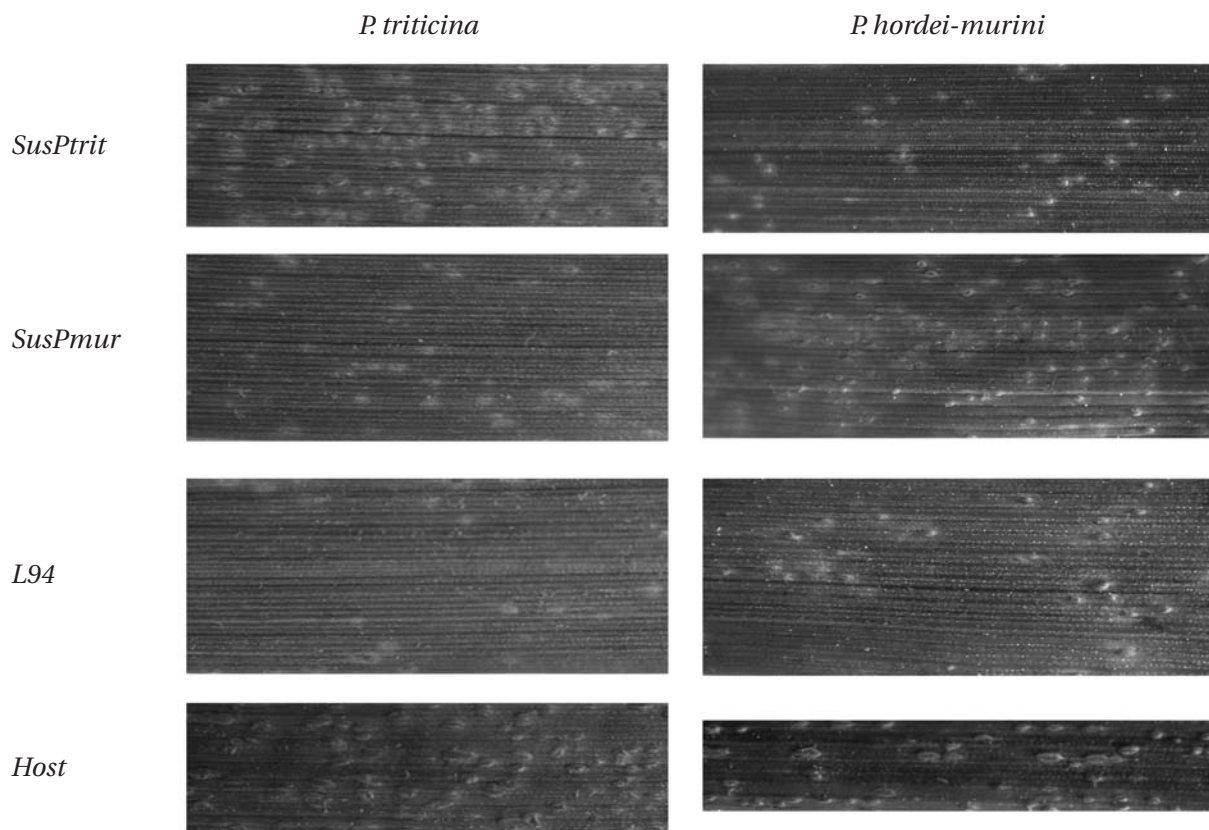
roestschimmels gaf een beeld van de fylogenetische verwantschap van de roesten. Er bleek geen tendens te zijn dat QTLs met effectiviteit tegen meer dan één roestschimmelsoort vooral effectief waren tegen soorten die nauw verwant waren. Hieruit volgt de hypothese dat de bij niet-waardresistentie betrokken QTLs specifieke en kwantitatieve herkenningfactoren coderen, die specifiek door de roest moeten worden aangepakt om met succes de niet-waardresistentiereactie te onderdrukken.

Diversiteit aan genen die betrokken zijn bij niet-waardresistentie

Een tweede RIL-populatie werd ontwikkeld uit een kruising

tussen de vatbare lijn SusPtrit en het resistente Zuidamerikaanse gerstras 'Cebada Capa'. Laatstgenoemde is evenals Vada en de meeste andere gerstrassen volledig resistent tegen heterologe roestschimmelsoorten. Verrassend was dat ook een uitsplitsing voor vatbaarheid voor heterologe roestschimmelsoorten in de standaard mapping populatie Oregon Wolfe Barleys (OWB) werd gevonden. In beide mapping populaties, Cebada Capa x SusPtrit (C x S) en OWB, werden de QTLs die betrokken zijn bij resistentie tegen vier heterologe roestschimmelsoorten, in kaart gebracht. De QTLs in beide populaties werden vergeleken met de QTLs die werden gevonden in de Vada x SusPtrit populatie. Voor de vergelijking van de posities van

PROMOTIES



Figuur 1. Infectiedichtheid van twee heterologe roestschimmels (*Puccinia triticina* en *P. hordei-murini*) op twee gerstlijnen (*SusPtrit* en *SusPmur*) die geselecteerd zijn op vatbaarheid voor deze roesten. Ter vergelijking één van de lijnen (*L94*) die genen voor vatbaarheid hebben geleverd en het niveau van infectie op de respectievelijke waardsoort (*host*).

PROMOTIES

de QTLs werd een geïntegreerde consensuskaart gebruikt. De resultaten bevestigden dat niet-waardresistentie in gerst tegen heterologe roestschimmelsoorten bepaald wordt door QTLs met verschillende en overlappende specificiteit. Ook een *R*-gen voor overgevoeligheidsresistentie droeg in sommige gevallen bij aan de niet-waardresistentie. In elke populatie waren verschillende combinaties van loci betrokken bij de resistentie, met erg weinig loci gemeenschappelijk. Dit suggereert een grote diversiteit in gerst van loci met genen voor niet-waardresistentie tegen heterologe roestschimmelsoorten. Deze loci waren significant geassocieerd met posities van QTLs voor partiële resistentie tegen het gerstpathogeen *P. hordei* en ook met loci waar met afweergerelateerde genen (defence gene homologues, DGH) gelegen zijn.

Onvolledige niet-waardresistentie tegen *Puccinia hordei-bulbosi*

Voor een serie gerstcollectie-nummers werd met behulp van een zaailingtoets de resistentie tegen *P. hordei-bulbosi* (*Phb*), de bruine roest van *Hordeum bulbosum*, bepaald. Er werd aangetoond dat sommige gerstlijnen (vooral exotische gerstrassen, landrassen en wilde gerstlijnen) in het zaailingstadium enigszins vatbaar zijn voor *Phb*. Dit impliceert dat gerst een 'bijna-niet-waard' is voor deze roestsoort. Vervolgens werd de genetische basis van de resistentie tegen *Phb* bestudeerd in de drie splitsende populaties die al eerder werden gebruikt: Vada x SusPtrit (VxS; Vada is volledig resistent), Cebada Capa x SusPtrit (CxS; Cebada Capa is

volledig resistent) en Oregon Wolf Barleys (OWB; Dom x Rec, Dom is volledig resistent). Een QTL-analyse gebaseerd op het aantal macroscopisch zichtbare infecties wees uit dat in elke mapping populatie een andere set genen de resistentie tegen *Phb* bepaalde: slechts één QTL werd zowel in de VxS als in de CxS populatie gevonden. Een QTL-analyse in de VxS populatie die gebaseerd was op microscopisch waargenomen infectiecomponenten, te weten koloniegrootte, vroege abortus zonder plantencel necrose en percentage infectie-eenheden dat geassocieerd is met plantencel necrose, resulteerde in de ontdekking dat elke infectiecomponent bepaald werd door een verschillende set genen. Dit impliceert dat de bijna niet-waardresistentie tegen *Phb* uit verschillende componenten bestaat, die elk gereguleerd worden door verschillende genen. Plantencel necrose werd vooral gevonden als slechts één of twee autofluorescerende cellen in relatief grote roestkolonies. Daarom mag geconcludeerd worden dat de resistentie van 'Vada' tegen deze heterologe roest in essentie niet op overgevoeligheid gebaseerd is.

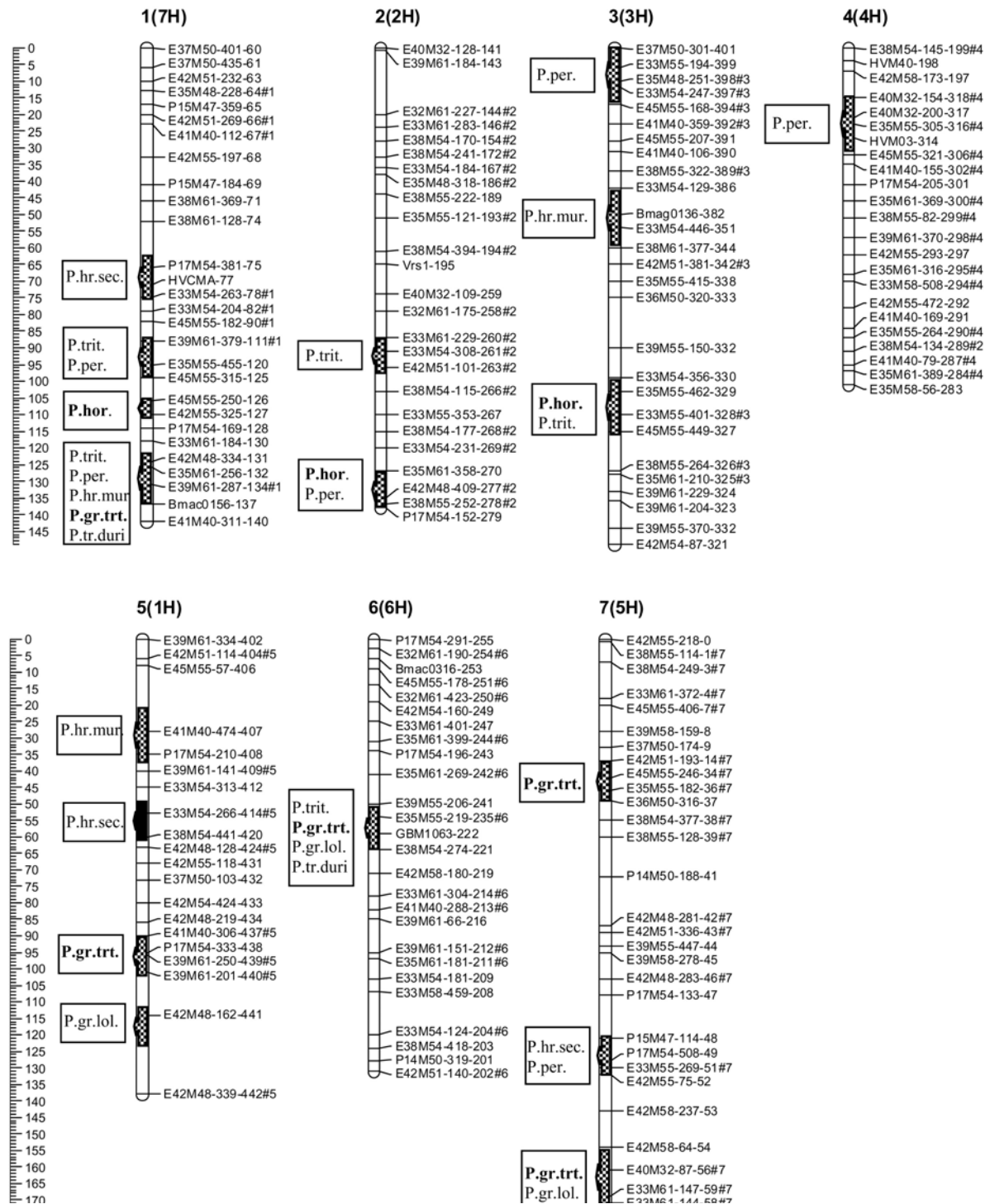
Conclusies

De resultaten die verkregen zijn laten zien dat gerst-*Puccinia* roesten een zeer vruchtbaar modelsysteem vormen om te onderzoeken welke factoren bepalen of een plantensoort een waard dan wel niet-waard is voor gespecialiseerde pathogenen. Het is duidelijk dat de waardstatus van gerst tegen roesten op een kwantitatieve overerving berust. De gevonden genen bepalen waarschijnlijk hoe gemakkelijk of moeilijk de basis-resistentie van de plant tegen roestschim-

mels onderdrukt kan worden. Dergelijke onderdrukking wordt waarschijnlijk teweeggebracht door zogenaamde 'effectors' die het pathogeen uitscheidt, en die interfereren met processen als herkenning en signaaltransductie in de plant. Het verrassende is dat voor elke roestsoort weer een andere combinatie van genen in het spel is, terwijl ook de immuniteit van verschillende gerstgenotypen steeds weer op een andere combinatie van genen berust.

Allerlei interessante vragen zijn met dit onderzoek opgeroepen, zoals: hoe kan het dat een vrij modern gerstras nog een overgevoeligheids-gen voor resistentie heeft tegen een onbeduidende roest (*Puccinia hordei-secalini*) van een onkruid-gerstsoort? Hoe komt het dat sommige van de niet-waard resistentiegenen effectief zijn tegen twee niet-nauwverwante roesten, maar niet tegen daaraan wel verwante roesten? Hoe komt het dat zwakke niet-waard resistentie vooral gevonden wordt in landrassen, met name een landras uit Indonesië, waar gerst een zeer weinig geteeld gewas is? Vormen de ontdekte QTLs één (of enkele) genfamilie(s), of zijn ze elk totaal verschillend van aard? Zijn de functionele allelen voor splitsende QTLs compatibiliteitsfactoren of resistentiefactoren?

Om dergelijke vragen te kunnen beantwoorden is het nodig enkele van de gevonden genen te isoleren, de basenvolgorde vast te stellen en hun vóórkomen in gerstpopulaties te bepalen. Het in dit onderzoek ontwikkelde materiaal en de daaraan verkregen data vormen een goede basis voor verdere exploratie van dit waard-pathogeensysteem.



PROMOTIES

Figuur 2. Koppelingskaart van de gerstpopulatie *Vada x SusPtrit*, met daarin aangegeven de chromosoomsegmenten die bijdragen aan de resistentie van *Vada* tegen acht roestschimmels. (P.trit. = *P. triticina* isolaat Flamingo, P.pers. = *P. persistens*, P.hor. = *P. hordei*, P.hr.sec. = *P. hordei-secalini*, P.hr.mur. = *P. hordei-murini*, P.gr.trt. = *P. graminis f. sp. tritici*, P.gr.lol. = *P. graminis f. sp. lolii*, P.tr.duri = *P. triticina* from *T. durum*). Roestnamen die in vet zijn aangegeven refereren naar roestschimmels waarvoor gerst een waardsoort is; de overige zijn heterologe roestschimmels.