

# Genetic architecture of basal resistance of barley to *Puccinia hordei*

Thierry Marcel

**Op 11 mei 2007 promoveerde Thierry Marcel aan Wageningen Universiteit op het proefschrift getiteld 'Genetic architecture of basal resistance of barley to *Puccinia hordei*'. Promotor was Prof. Dr. R.G.F. Visser en co-promotor was Dr. Ir. R.E. Niks, beiden verbonden aan de leerstoelgroep Plantenveredeling van Wageningen Universiteit. Het onderzoek werd uitgevoerd bij diezelfde leerstoelgroep en gefinancierd door NWO/ALW.**

## **Partiële resistentie berust op genen met kleine effecten**

Partiële resistentie van gerst (*Hordeum vulgare*) tegen de pathogene dwergroestschimmel *Puccinia hordei* berust op een niet-overgevoeligheidsreactie vóór de vorming van haustoria in de plantencel. Kennelijk is het voor het pathogeen moeilijk zich aan te passen aan partiële resistente gerst. Dat blijkt uit het feit dat de resistentie duurzaam effectief is, terwijl andere soorten plantenresistentie ineffectief kunnen worden doordat de schimmelpopulatie zich aanpast. De gerst – *P. hordei* relatie dient als modelsysteem voor vele andere plant-pathogeencombinaties, waar een dergelijke resistentievorm ook voorkomt.

Partiële resistentie wordt veroorzaakt door het cumulatieve effect van verscheidene genen,

die elk een klein effect hebben. De plaatsen waar deze genen zich op de gerstchromosomen bevinden worden QTLs genoemd. De gerstcultivar 'Vada' heeft een hoog niveau van partiële resistentie, welke gebaseerd is op een combinatie van tenminste zes QTLs. Drie ervan hebben een relatief groot effect op het niveau van partiële resistentie. Door middel van terugkruising werden deze drie genen ingebracht in de zeer vatbare gerstlijn L94, wat resulteerde in bijna-isogene lijnen (NILs). We ontwikkelden ook de reciproke NILs, waarin de vatbaarheidsallelen van die QTLs uit L94 werden ingebracht in de genetische achtergrond van 'Vada'. Deze NILs werden gebruikt om het effect van de individuele genen te bepalen in een constante genetische achtergrond. We vergeleken de positie van QTLs voor partiële resistentie in vijf populaties van gerst, die elk de nakomelingschap waren van twee ouders. Hieruit bleek dat er een verrassende diversiteit in genen bestaat die bijdragen aan partiële resistentie: slechts enkele van de QTLs die ontdekt werden in de ene gerstlijn droegen ook in een andere gerstlijn bij aan partiële resistentie.

Hoewel partiële resistentie in het algemeen effectief is tegen alle genotypen van de pathogene schimmel, toonden de resultaten met de NILs duidelijk aan dat individuele QTLs effectief tegen het ene genotype

van de schimmel en ineffectief tegen andere genotypen kunnen zijn. Omdat gerstrassen met een behoorlijk niveau van partiële resistentie meestal verscheidene QTLs voor die eigenschap bezet hebben met het resistentieallel, impliceert ineffectiviteit van één van de QTLs tegen een of andere variant van de schimmel niet dat de plant dan volledig vatbaar wordt. De overige QTLs beperken nog steeds het pathogeen en de epidemische uitbreiding daarvan. Daardoor is de specificiteit van individuele QTLs voor varianten van de schimmel niet direct dramatisch voor het resistentieniveau van dat gerstras.

## **Vorbereidingen ter isolatie van een gen voor partiële resistentie**

De NILs hielpen ook om de precieze positie te bepalen van het QTL waarop het gen ligt met het grootste effect: *Rphq2*. Dit gen is gesitueerd bij de top van de lange arm van Chromosoom 2H, waar het gelokaliseerd kon worden in een stukje van ongeveer 0.1 cM, geflankeerd door twee merkers. Deze merkers zijn in het kader van dit onderzoek ontwikkeld door gebruik te maken van de gelijkenis in DNA tussen gerst en rijst voor dat chromosoomsegment. De beschikbaarheid van de volledige DNA-basenvolgorde van rijst was nuttig om soortgelijke basenvolgordes te vinden in het

PROMOTIES

gerst-DNA op homologe chromosoomsegmenten. Gen *Rphq2* biedt de beste perspectieven voor isolatie en basenvolgordebepaling van een gen voor partiële resistentie, en daardoor voor begrip van de moleculaire functie daarvan in de verdediging van de plant tegen gespecialiseerde micro-organismen als *P. hordei*. Het gen heeft een relatief hoog fenotypisch effect op het niveau van resistentie van gerst tegen *P. hordei* en is gesitueerd in een chromosoomsegment met een hoge frequentie van recombinatie. Dat betekent dat elke centi-Morgan op de genetische kaart rond het gen waarschijnlijk correspondeert met slechts een relatief kort stukje DNA-sequentie. Dit moet het in de nabije toekomst mogelijk maken het gen te vinden in een bacteriële DNA-(BAC-) bibliotheek.

### Integratie van genetische koppingskaarten van gerst

Voor de fijn-kartering van *Rphq2* werden verscheidene moleculaire en genetische strategieën toegepast. Daarbij bleek dat het mogelijk en gewenst was om de genetische koppingskaarten van zes gerstpo-

pulaties te integreren. Elk van die kaarten was gebaseerd op RFLP-, AFLP- en/of SSR-merkers. Vrij veel van de merkers splitsten uit in meer dan een van de zes populaties, wat het mogelijk maakte de kaarten te combineren tot een nieuwe, geïntegreerde kaart, die meer dan 3200 merkerloci omvat. Dit is de meest merker-dichte genetische kaart van gerst die op dit moment gepubliceerd is. Het was voor dit werk belangrijk om de kaartpositie van SSR-merkers te bepalen in additionele populaties en om nieuwe SSR-merkers te ontwikkelen. SSR-merkers zijn DNA-merkers die gebaseerd zijn op een repetitief element binnen een bepaalde DNA sequentie. Het aantal elementen dat men aantreft varieert, en zorgt daardoor voor een hoge mate van polymorfie. Dit type merker is technisch eenvoudig toe te passen. De combinatie van SSR-merkergegevens van verscheidene laboratoria, inclusief het onze, resulteerde in de ontwikkeling van een geïntegreerde genetische kaart waarop de posities van bijna 800 SSR-merkerloci zijn samengebracht. De uitbreiding van de merker-datasets met merkers die gebaseerd zijn op sequenties van tot expressie komende genen

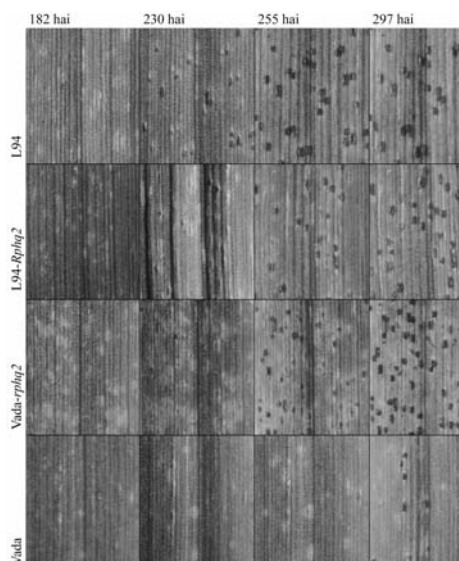
(zogenaamde EST-merkers) verschaft mogelijkheden de distributie van QTLs over het genoom te vergelijken met de distributie van 'defence gene homologues'. Dit

zijn sequenties met homologie met genen die betrokken zijn bij resistentiereacties van planten tegen pathogenen. Deze vergelijking leidde tot de identificatie van genen die wellicht een rol spelen in de genetische basis van partiële resistentie.

### Tot slot

Dr. Marcel heeft sterk verbeterde genetische koppingskaarten ontwikkeld in gerst, en daarmee de isolatie van een gen voor partiële resistentie dichterbij gebracht. Daarmee zal duidelijk worden wat de moleculair-genetische basis is van partiële resistentie. De resultaten zijn wellicht generaliseerbaar naar andere plant-pathogeencombinaties, waarin partiële resistentie vaak aangetroffen wordt, maar relatief weinig onderzocht is.

Het onderzoek van Dr. Marcel wordt door hem aan dezelfde vakgroep voortgezet, als onderdeel van het EU-BIOEXPLOIT-programma. De merkers die het gen *Rphq2* flankeren konden worden teruggevonden in de BAC-bibliotheek die van de partieel resistente en de vatbare ouderplanten is gemaakt. Daarmee zijn de DNA-segmenten die *Rphq2* bevatten in handen. De uitdaging is nu om te ontdekken hoeveel en welke genen op die segmenten gelegen zijn, en welke daarvan verantwoordelijk is voor het resistentie-effect.



Figuur 1. Segmenten van zaailingbladeren van de zeer vatbare lijn L94, de partieel resistente lijn Vada, en twee bijna-isogene lijnen. L94-Rphq2 bevat het resistentieallel van Vada in de vatbare achtergrond van L94, en Vada-rphq2 het vatbaarheidsallel van L94 in de partieel resistente achtergrond van Vada. Per genotype is hetzelfde bladsegment op vier tijdstippen (aangegeven als hai: uren na inoculatie met *Puccinia hordei*) gefotografeerd. De foto laat duidelijk zien dat de pathogene schimmel op Vada de meeste tijd nodig heeft rijpe puustjes te ontwikkelen, en op L94 de minste tijd.

PROMOTIES