

Het *Phytophthora infestans*-avirulentiegen *PiAvr4* en zijn tegenhanger in aardappel, het resistentiegen *R4*

Pieter M.J.A. van Poppel

Laboratorium voor Fytopathologie, Wageningen University en Centre for BioSystems Genomics, Wageningen; e-mail: pieter.vanpoppel@gmail.com

Op 4 februari 2009 promoveerde Pieter M.J.A. van Poppel aan Wageningen University op een proefschrift getiteld 'The *Phytophthora infestans* avirulence gene *PiAvr4* and its potato counterpart *R4*'. Promotoren waren Prof.dr.ir. F. Govers en Prof.dr.ir. P.J.G.M. de Wit, beiden verbonden aan de leerstoelgroep Fytopathologie van Wageningen Universiteit. Het onderzoek, dat plaatsvond bij bovengenoemde leerstoelgroep, werd financieel ondersteund door het Centre for BioSystems Genomics, dat een onderdeel is van het Netherlands Genomics Initiative en de Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (NWO). De volledige tekst van het proefschrift is als pdf file beschikbaar in de digitale bibliotheek van Wageningen University (<http://edepot.wur.nl/163>).

Inleiding

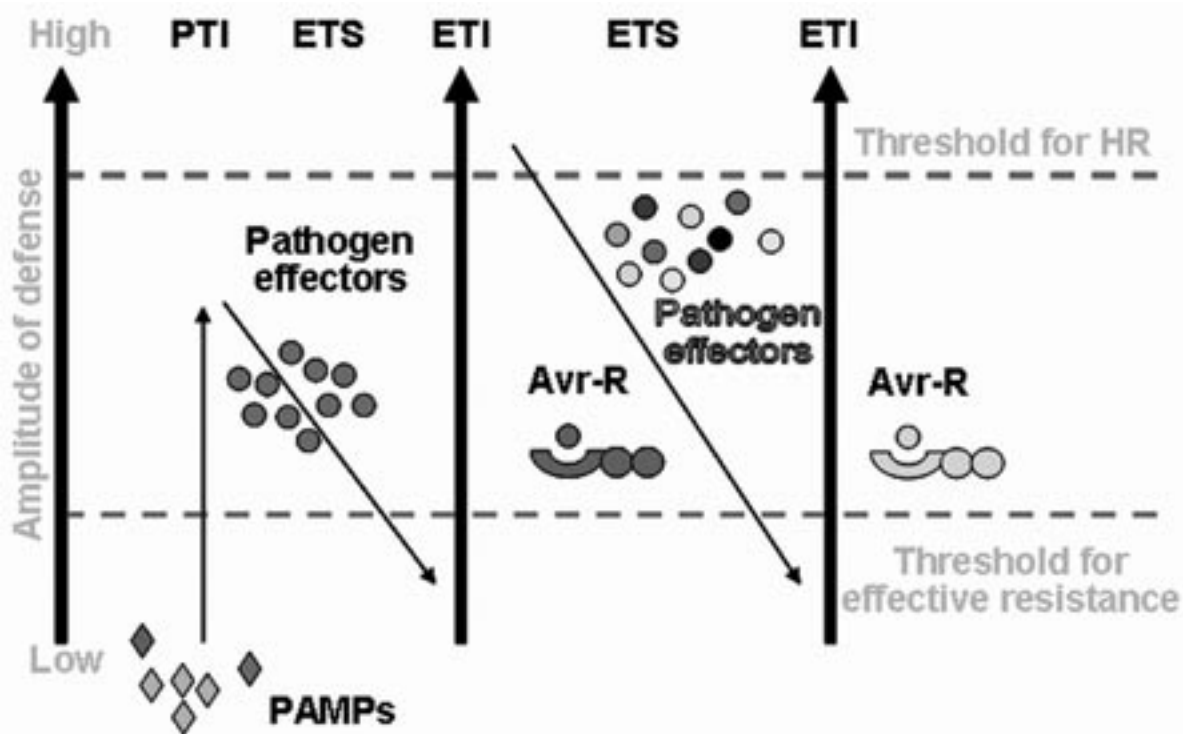
De aardappelziekte, die wordt veroorzaakt door de oömyceet *Phytophthora infestans*, is wereldwijd een van de grootste problemen in de aardappelteelt. In de afgelopen jaren zijn nieuwe instrumenten en genomische databanken ontwikkeld voor verschillende oömycete plantpathogenen, zoals voor verschillende soorten binnen de genera *Phytophthora*, *Hyaloperonospora*, *Pythium* en *Aphanomyces*. Dit was een enorme stimulans voor onderzoek aan oömyceten en heeft geleid tot de identificatie van genen die betrokken zijn bij diverse biologische processen, zoals voortplanting, signaaloverdracht en pathogenese.

Een van de methoden die aardappelveredelaars gebruiken voor het verkrijgen van rassen die resistent zijn tegen *Phytophthora infestans* is het

inkruisen van resistentie uit wilde aardappelsoorten in de gecultiveerde aardappel, *Solanum tuberosum*. De ziekteverwekker is echter vaak in staat deze resistentie te doorbreken met als gevolg dat snel na de invoering van nieuwe cultivars de resistentie verdwenen is. Om te weten welke mechanismen ten grondslag liggen aan dit verlies van resistentie is het van groot belang om inzicht te krijgen in effectoren die het pathogeen produceert. Volgens het gen-om-gen-model coderen avirulentie (*Avr*) -genen voor effectoren die afweerreacties in de plant activeren. Zo'n afweerreactie treedt alleen op als er een passend resistentie-eiwit is en de plant dus beschikt over het juiste resistentie (*R*) -gen (Figuur 1). Dit proefschrift beschrijft enerzijds de identificatie van een *P. infestans*-*Avr*-gen, in het bijzonder de avirulentie- en effector-activiteit, de domeinstructuur en de subcellulaire lokalisatie van het *Avr*-eiwit, en anderzijds de specificiteit van het bijbehorende aardappel-*R*-gen.

Het *Avr4*-gen codeert voor een RXLR-dEEReffector-eiwit

PiAvr4, een gen dat codeert voor een RXLR-dEER-effector-eiwit (Figuur 2A), werd geïsoleerd met behulp van AFLP-merkers waarmee BAC-klonen werden geselecteerd, en cDNA-AFLP-merkers voor identificatie van kandidaatgenen. Transformatie van fysische *P. infestans*-isolaten met *PiAvr4* resulteerde in transformanten die avirulent waren op de *R4*-aardappelkloon die onderdeel uitmaakt van de Mastenbroek differentiële set (kloon Ma-R4) (Figuur 3). Bovendien resulteerde *in planta*-expressie van *PiAvr4* in een overgevoeligheidsreactie op kloon Ma-R4, maar



Figuur 1. Het zig-zagmodel zoals gepresenteerd door J.D.G. Jones en J.L. Dangl in *Nature* (2006, vol. 444, pag. 323-329), illustreert de sterkte van de verdediging van een waardplant tegen aanval door een pathogeen en de daaropvolgende wapenwedloop. De plant herkent pathogeen-geassocieerde moleculaire patronen (PAMPs). De herkenning van deze PAMPs leidt tot immuniteit (PTI: pathogen triggered immunity), wat resulteert in remming van de groei van het pathogeen. Dit pathogeen zal de PTI daarom willen onderdrukken met behulp van zogenoemde effectoren. Die effectoren veroorzaken het verlies van resistentie in de plant (ETS: effector triggered susceptibility). Als reactie daarop ontwikkelt de plant resistentie-eiwitten (veelal NBS-LRR-eiwitten) die specifiek de effectoren van deze ziekteverwekker herkennen. Dit laatste veroorzaakt dan weer een immuniteit (ETI: effector triggered immunity), die visueel zichtbaar is als een overgevoeligheidsreactie (HR). Het pathogeen zal op deze nieuwe situatie anticiperen door de effectoren aan te passen waardoor de ETI omzeild wordt.

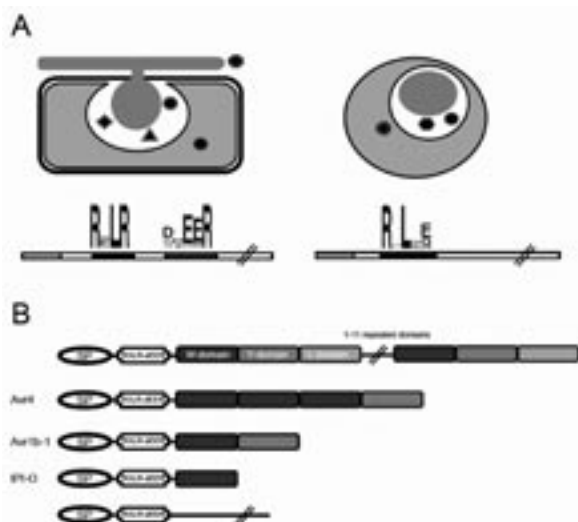
PROMOTIES

niet op *r0*-aardappelplanten zoals Bintje. Hiermee is bewezen dat *PiAvr4* het avirulentiegen is dat een gen-om-gen-interactie heeft met het *R4*-gen in de aardappelkloon Ma-R4. In andere geïdentificeerde avirulentie-eiwitten zijn één of enkele aminozuurveranderingen in het eiwit vaak al voldoende om de avirulentiefunctie te verliezen. In het geval van *PiAvr4*, hebben fysio 4-isolaten mutaties die een verschuiving geven in het open leesraam, hetgeen resulteert in een klein eiwit dat niet functioneel is als avirulentiefactor.

Herkenning van het *Avr4*-eiwit door resistentiegen *R4*

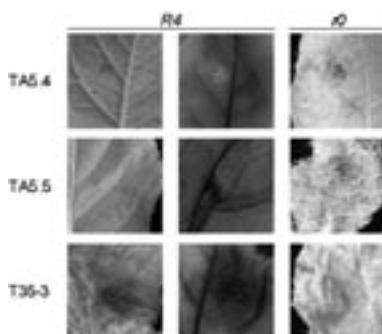
Genen die behoren tot de RXLR-dEER-effectorfamilie, zoals het hierboven beschreven *PiAvr4*, evolueren zeer snel. De selectieve druk is voornamelijk gericht op het deel dat codeert voor de C-terminus. Ondanks deze selectieve druk heeft de meerderheid van de RXLR-dEER-

eiwitten herkenbare C-terminale motieven, genaamd W, Y en L en vernoemd naar aminozuren tryptofaan (W), tyrosine (Y) en leucine (L) die op geconserveerde plaatsen in deze motieven voorkomen (figuur 2B). Zo heeft de effector *PiAvr4* drie W-motieven (W1, W2 en W3) en een enkel Y-motief. Deze verschillende motieven werden, ingebed in de omliggende regio's, getest voor avirulentieactiviteit op Ma-R4-planten. Agroinfectie met constructen die een W2-motief in combinatie met hetzij een W1 of W3-motief bevatten resulteerde in een overgevoeligheidsreactie in de Ma-R4-kloon en niet in Bintje. Daarnaast werd aangetoond dat het *PmirAvh4*-gen uit *Phytophthora mirabilis*, dat homoloog is aan *PiAvr4*, ook in staat is zo 'n overgevoeligheidsreactie te veroorzaken op een Ma-R4-aardappelkloon.



Figuur 2. A. De infectiestrategieën van plantpathogene oömyceten en de malariaparasiet *Plasmodium* vertonen verscheidene overeenkomsten. Oömyceten penetreren plantencellen met behulp van haustoria (links). *Plasmodium* leeft in een parasitofore vacuole (PV) (rechts). Zowel het haustorium en de PV zijn omringd door een membraan die door de gastheercel zelf is gevormd. De ziekteverwekkers scheiden effectoren uit die naar de gastheercel worden getransporteerd. Die effectoren zijn daartoe uitgerust met een speciaal motief, een RXLR-motief in oömyceten en een PEXEL/VTS-motief in *Plasmodium*. Dit motief bevindt zich in het N-terminale deel van het eiwit aansluitend aan het signaalpeptide (aangegeven in lichtgrijs). Het dEER-motief is aanwezig in de meeste maar niet alle oömycete RXLR-effectoren. De conservering van bepaalde aminozuren in deze motieven wordt geïllustreerd door de grootte van de letters in de sequentie-logo's.

B. De C-terminale regio in RXLR-dEER-effectoren is zeer divers, zowel in aminozuurvolgorde als in lengte en bevat diverse, zichzelf herhalende motieven. Er worden drie motieven onderscheiden die vernoemd zijn naar een geconserveerd aminozuur (W, Y of L). De motieven kunnen voorkomen in verschillende combinaties. Soms ontbreken een of meerdere motieven of is geen enkel motief herkenbaar. De figuren illustreren de variatie in bekende avirulentie-eiwitten. PiAvr4 en IPI-O zijn *Phytophthora infestans*-effectoren terwijl Avr1b-1 een *Phytophthora sojae*-effector is.



Figuur 3. *Phytophthora infestans*-isolaten met PiAvr4 zijn avirulent op aardappelplanten met resistentiegen R4Ma. *P. infestans*-isolaat T35-3 is virulent op de aardappelrassen Bintje (r0, zonder bekende resistentie) and Cebeco44-31-5 (met resistentiegen R4Ma). Dit isolaat werd getransformeerd met het avirulentiegen PiAvr4. Twee transformanten (TA5.4 and TA5.5) waarvan PiAvr4 in het genoom geïntegreerd is, blijven virulent op Bintje maar zijn avirulent op R4Ma planten. De R4Ma bladeren in de middelste kolom zijn dezelfde bladeren als in de linker kolom maar zijn gekleurd met trypaanblauw om de kolonisatie zichtbaar te maken.

In vivo-localisatie van de RXLR-dEER-effectoren Avr4 en IPI-O

Van een aantal *Phytophthora*-RXLR-dEER-effectoren is aangetoond dat ze gericht in de cellen van de gastheerplant afgeleverd worden en dat het RXLR-dEER-motief vereist is voor deze translocatie. Om te onderzoeken of ook Avr4 getransporteerd wordt naar de gastheercel werd een fysio 4-*P. infestans*-stam getransformeerd met een construct dat codeert voor PiAvr4 met aan de C-terminus een rood fluorescerend eiwit (mRFP). Op deze manier kon met behulp van fluorescentie-microscopie in deze transformanten specifieke mRFP-fluorescentie worden waargenomen. Om de ontwikkeling van de infectie microscopisch te kunnen volgen werd gebruik gemaakt van geëtiolerde *in vitro* geteelde aardappelplantjes die werden geïnoculeerd met *P. infestans*-zoösporen. Deze nieuwe experimentele opzet heeft als voordeel dat de autofluorescentie van chlorofyl, die de fluorescentie van mRFP kan overschaduwen en dus de microscopische analyse in groen plantenweefsel verstoort, niet aanwezig is. Het gebrek aan chlorofyl bleek de infectie niet te verstoren; zoösporen vormden cysten en ontkiemden, en mycelium was in staat de geëtiolerde weefsels te penetreren. Met behulp van fluorescentie-microscopie kon in de transformanten specifieke mRFP-fluorescentie worden waargenomen in het topje van de kiembuis van kiemende cysten. Tijdens infectie van de geëtiolerde aardappelplantjes bleek fluorescentie gelokaliseerd te zijn aan de basis van haustoria. Haustoria zijn zeer gespecialiseerde voedingsstructuren die nauw verbonden zijn met de plantencel en die mogelijk een rol hebben in het uitscheiden van effectoren naar de gastheercel.

R4-aardappelklonen herkennen verschillende fysio's

In het verleden zijn twee verschillende aardappelklonen ontwikkeld als R4-differentiële kloon. De differentiële set, ontwikkeld in Nederland door Mastenbroek, bevat kloon Cebeco-44-31-5 (Ma-R4) en de differentiële set ontwikkeld door Black in Schotland bevat kloon 1563 c (14) (Bl-R4). Virulentietoetsen met verschillende *P. infestans*-isolaten toonden aan dat de Bl-R4-kloon gevoelig is voor alle isolaten die avirulent zijn op kloon Ma-R4. Slechts één enkel isolaat bleek avirulent te zijn op kloon Bl-R4, maar virulent op Ma-R4. Bovendien vertoonde de Ma-R4-kloon, maar niet de Bl-R4-kloon, overgevoeligheid als reactie op kunstmatige expressie van *PiAvr4* in bladeren met behulp van PVX als vector. Vergelijkbaar met R3 lijkt R4 niet een eenduidig, enkel R-gen te zijn. De genen *R3a* en *R3b* liggen op één locus, maar of dit ook het geval is voor de twee R4-genen (respectievelijk benoemd als *R4^{Ma}* en *R4^{Bl}*) moet nog worden onderzocht. Analyse van twee onafhankelijke aardappelpopulaties toonde aan dat R4-resistentie tegen avirulente *P. infestans*-isolaten 1:1 uitsplitst in beide F1-populaties and dit suggereert dat *R4^{Ma}*-resistentie wordt bepaald door een enkel dominant allel. Meer diepgaande studies naar de herkenning van Avr4 door het corresponderende R-eiwit worden belemmerd doordat het *R4^{Ma}*-resistentiegen nog niet geïsoleerd is. 'Nucleotide Binding Site (NBS) profiling' werd gebruikt voor het genereren van merkers gekoppeld aan *R4^{Ma}*. NBS profiling is gebaseerd op PCR-amplificatie van geconserveerde NBS-motieven in R-genen en R-genhomologen. Voor een 'Bulked Segregant Analysis' (BSA), werd het DNA van respectievelijk resistente en gevoelige nakomelingen uit een F1-populatie gebundeld en gebruikt als startmateriaal voor NBS profiling. In de BSA werden verscheidene kandidaat-merkers gevonden. Vervolgens werden alle beschikbare nakomelingen getest en werd één enkel fragment gevonden dat met de *R4^{Ma}* weerstand overerft. Nader onderzoek moet uitwijzen of deze merker bruikbaar is voor isolatie van het *R4^{Ma}* resistentiegen.

Tenslotte

Zoals beschreven in de inleiding en de algemene discussie van het proefschrift zijn de afgelopen jaren, dankzij de genomica, veel nieuwe genen ontdekt in plantpathogene oömyceten. Van een aantal *Phytophthora*- en valse meeldauwsoorten die in meer detail onderzocht zijn, fungeren er enkele als model voor onderzoek aan oömyceet-

plant interacties. Een inventarisatie van het secretoom van oömyceten heeft geleid tot de indentificatie van een grote familie van RXLR-dEER-effectoren die bestaat uit snel evoluerende eiwitten waartoe alle tot nu toe geïdentificeerde *Phytophthora*-avirulentie-eiwitten behoren. Recentelijk is aangetoond dat het RXLR-dEER-motief zorgt voor de translocatie van effectoren naar de gastheercel. De experimentele resultaten beschreven in het proefschrift dragen bij aan een beter inzicht in de moleculaire basis van genom-gen-interacties en de rol van RXLR-dEER-effectoren in deze interacties. Het is evident dat *P. infestans* verschillende tactieken gebruikt om herkenning van een RXLR-dEER-effector door een R-eiwit te omzeilen. Deze kennis is bepalend voor de strategie die gebruikt wordt om via (moleculaire) resistentieveredeling duurzame resistentie tegen de aardappelziekte te verkrijgen.

Publicaties op basis van het proefschrift

- Bouwmeester, K, van Poppel, PMJA & Govers, F (2009) Genome biology cracks enigmas of oomycete plant pathogens. In: Annual Plant Reviews – Molecular Aspects of Plant Disease Resistance (JE Parker, ed), Wiley-Blackwell 34: 102-133
- van Poppel PMJA, Guo J, van de Vondervoort PJJ, Jung MWM, Birch PRJ, Whisson SC & Govers F (2008) The *Phytophthora infestans* avirulence gene *Avr4* encodes an RXLR-dEER effector. Molecular Plant-Microbe Interaction 21: 1460-1470
- van Poppel PMJA, Jiang RHY, Śliwka J & Govers F (2009) Recognition of *Phytophthora infestans* Avr4 by potato R4 is triggered by C-terminal domains comprising W motifs. Molecular Plant Pathology 10: 611-620
- van Poppel PMJA, Huigen, D-J & Govers F (2009) Differential recognition of *Phytophthora infestans* races in potato R4 breeding Lines. Phytopathology 99 (10): 1150-1155

De auteur is sinds mei 2008 werkzaam als moleculair veredelaar bij De Ruiter Seeds in Bergschenhoek.

Stelling:

De resultaten van resistentietoetsen zijn nietszeggend als gegevens over de identiteit van de gebruikte isolaten van het pathogeen ontbreken; zelfs informatie over het fysio is niet afdoende.

PROMOTIES