

# Herkenning van de elicitor Ecp2 van *Cladosporium fulvum* in tomaat en niet-waard planten

M. de Kock

Op 4 oktober 2004 promoveerde Maarten de Kock aan de Wageningen Universiteit op het proefschrift getiteld 'Recognition of the *Cladosporium fulvum* Ecp2 elicitor in tomato and non-host plants'. Promoter was Prof. dr.ir. P.J.G.M. de Wit (Laboratorium voor Fytopathologie) en co-promotoren waren dr. P. Lindhout (Laboratorium voor Plantenveredeling) en Dr. ir. B.F. Brandwagt (Laboratorium voor Fytopathologie). Het onderzoek werd gefinancierd door de Technologiestichting STW.

## Inleiding

Pathogenen beschikken over verschillende strategieën om planten te kunnen infecteren. Planten hebben daarentegen verschillende barrières ontwikkeld om pathogenen tegen te houden of actief te bestrijden. Bij één van deze barrières zijn resistentie (*R*) genen betrokken. *R* genen stellen de plant in staat ziekteverwekkers te herkennen wanneer deze complementaire avirulentie (*Avr*) genen of elicitors bevatten. De interactie tussen de pathogene schimmel *Cladosporium fulvum* en zijn gastheer tomaat (*Lycopersicon*) is een geschikt modelsysteem om interacties tussen planten en ziekteverwekkers te bestuderen. Bij de resistentie van tomaat tegen *C. fulvum* zijn vaak *Cf* of *Hcr9* (homoloog van het *Cladosporium fulvum* resistentie gen *Cf-9*) resistentiegen betrokken die genetisch gelokaliseerd zijn in het Milky Way cluster op de korte arm van Chromosoom 1 (Figuur 1). De *Cf* genen coderen voor eiwitten die waarschijnlijk in het plasmamembraan van de plantencellen verankerd liggen. Hierbij ligt het grootste deel van de *Cf* eiwitten, die rijk zijn

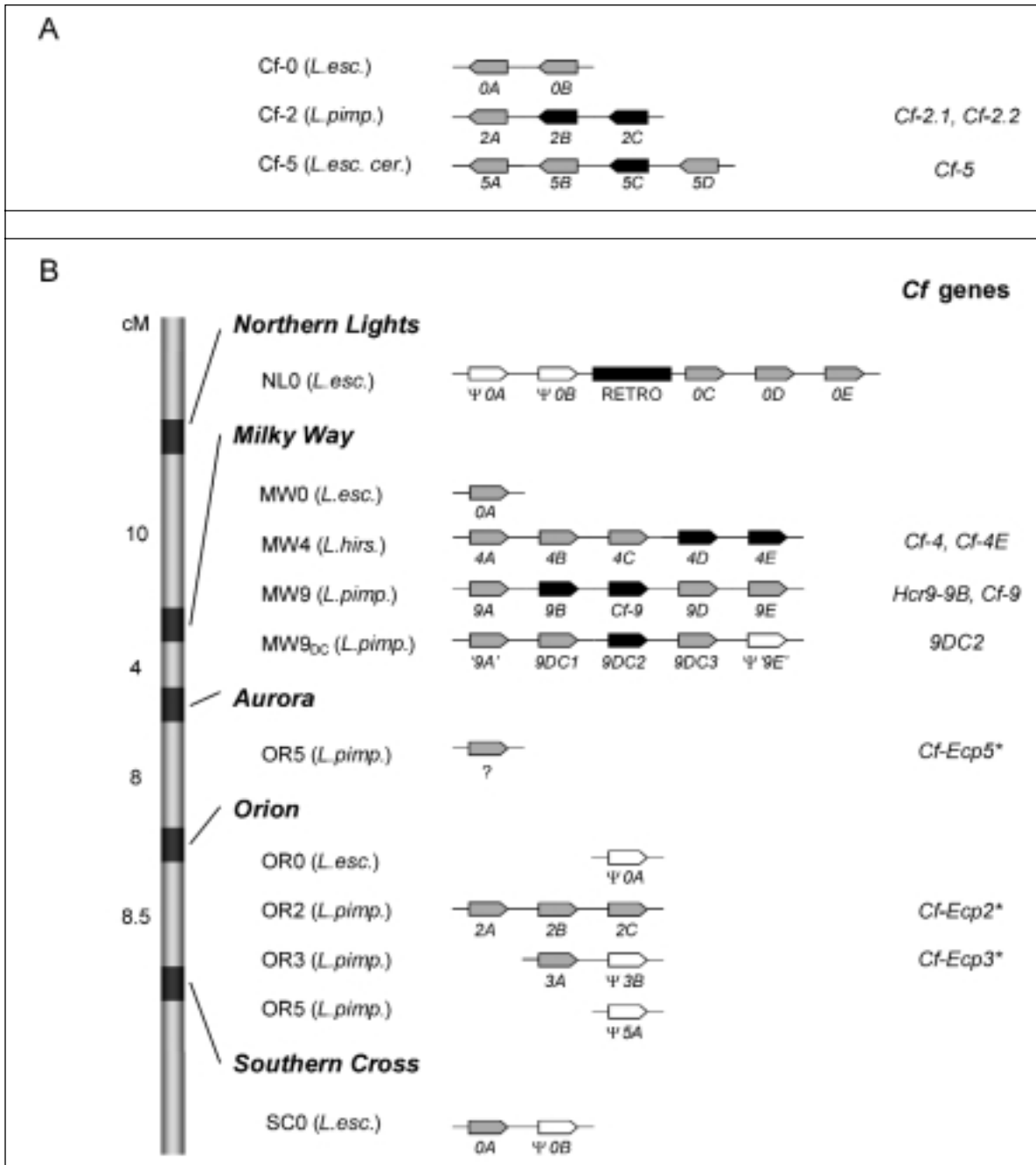
aan leucine-rijke repeats (LRRs), aan de buitenkant van de cel. De *Cf* eiwitten zijn betrokken bij de specifieke herkenning van bepaalde avirulentie (*Avr*) eiwitten van *C. fulvum*. Deze *Avr* producten zijn echter niet essentieel voor de pathogeniteit van *C. fulvum*. De schimmel kan de *Avr* genen veranderen waardoor er geen herkenning meer plaats vindt en resistentie wordt doorbroken. Het resistentiegen *Cf-Ecp2* is gelokaliseerd in het *Orion* cluster op de korte arm van Chromosoom 1 en is betrokken bij de specifieke herkenning van de elicitor Ecp2 (Figuur 1). Er zijn aanwijzingen dat Ecp2 belangrijk is voor de pathogeniteit van *C. fulvum*. Het zal daarom moeilijk zijn Ecp2 te veranderen zodat het niet meer door de plant herkend kan worden, maar nog steeds de biologische functie behoudt. Er wordt daarom verwacht dat het *Cf-Ecp2* resistentiegen een bijdrage zal kunnen leveren aan duurzame resistentie. Het grootste gedeelte van dit promotieonderzoek was gericht op het kloneren van het *Orion* cluster en de identificatie van het *Cf-Ecp2* resistentiegen. Tevens werden de herkenning van Ecp2 door ver-

schillende *Nicotiana* soorten en de wereldwijde variatie van elicitors van *C. fulvum* beschreven onderzocht. De resultaten vormen een wetenschappelijke basis voor de co-evolutie tussen planten en pathogenen en maken een voorzichtige voorspelling van de duurzaamheid van resistentiegen mogelijk.

## Identificatie van het *Orion* resistentiecluster

De kloneringsstrategie van het *Orion* cluster is gebaseerd op het gebruik van gekoppelde moleculaire merkers en homologie met bekende *Cf* genen. Er is een methode geoptimaliseerd waarmee kloon-specifieke fingerprintgegevens gegenereerd zijn die gebruikt werden voor het berekenen van genomische DNA contigs. In het *Orion* cluster zijn drie *Hcr9* genen geïdentificeerd die kandidaat zijn voor het *Cf-Ecp2* resistentiegen. Met behulp van een PCR-kloningsstrategie die gebaseerd is op *Orion*-specifieke DNA sequenties, zijn orthologe *Hcr9* genen geïdentificeerd in andere *Lycopersicon* haplotypen en soorten. De orthologe *Orion Hcr9* genen zijn onderling zeer homoloog. Echter, op basis van DNA- en eiwit homologie vormen ze een subgroep ten opzichte van de reeds bekende *Hcr9* genen. Dit geeft aanleiding tot een

PROMOTIES



PROMOTIES

Figuur 1. (A) Schematische organisatie van de Hcr2 genclusters op Chromosoom 6 in verschillende *Lycopersicon* haplotypen. Cf-0: *L. esculentum*; Cf-2: *L. pimpinellifolium*; Cf-5: *L. esculentum* var. *cerasiforme*. (B) Genomische positie, genetische afstand (cM) en schematische organisatie van de Northern Lights, Milky Way, Aurora, Orion en Southern Cross Hcr9 loci gelokaliseerd op de korte arm van Chromosoom 1 in verschillende *Lycopersicon* haplotypes. Genetische kaart met de verschillende clusters en de relatieve positie van de vijf Hcr9 loci (links); schematische organisatie van elk Hcr9 cluster (midden) en de functionele resistentie genen aanwezig in een cluster (rechts). Pijlen geven de relatieve positie en de oriëntatie weer van een Hcr9; witte pijl, Hcr9 pseudogeen; grijze pijl, Hcr9 met onbekende functie; zwarte pijl, functioneel Hcr9 resistentiegen. Hcr9 clusters zijn afkomstig uit verschillende haplotypen: *L. esculentum* Cf0; MW0, *L. esculentum* Cf0; MW4, *L. hirsutum* Cf4; MW9, *L. pimpinellifolium* Cf9; MW9<sub>DC</sub>, *L. pimpinellifolium* 9DC; OR0, *L. esculentum* Cf0; OR2, *L. pimpinellifolium* Cf-Ecp2; OR3, *L. pimpinellifolium* Cf-Ecp3; OR5, *L. pimpinellifolium* Cf-Ecp5; SC0, *L. esculentum* Cf0. De organisatie van het Aurora cluster is onbekend, RETRO in het NL cluster duidt de insertie van een retrotransposon aan.

discussie over de evolutionaire afkomst van deze genen.

Een *Hcr9 resistance gene analogue* (RGA) fingerprint methode is ontwikkeld ter ondersteuning van het haplotyperen, kloneren en bestuderen van *Hcr9* gen-expressie. Deze methode genereert een nieuw type genetische merkers specifiek voor de genen waaraan het onderzoek wordt verricht. De aanwezigheid van zowel geconserveerde als zeer variabele DNA-sequentie-omeinen wordt gebruikt in een PCR-reactie die gevolgd wordt door een DNA-restrictie analyse. De ontwikkeling van een fluorescente eindlabelingsmethode maakt het mogelijk het complexe RGA fingerprintpatroon met hoge resolutie te scheiden en te detecteren met een geautomatiseerde LICOR sequencer. De betrouwbaarheid van de RGA-fingerprint methode is getest met de analyse van bijna-isogene veredelingslijnen en de analyse van het dominante *Cf-Ecp2* en het recessieve *cf-ecp2* allel. Er zijn meerdere RGA-merkers geïdentificeerd die gekoppeld zijn aan *Cf-Ecp2* resistentie. Allen zijn afkomstig van de *Hcr9* genen die in het *Cf-Ecp2* *Orion* cluster aanwezig zijn. Op basis van de verkregen resultaten kan geconcludeerd worden dat deze methode zeer geschikt is om gerelateerde genen van elkaar te kunnen onderscheiden. De methode is daarom tevens gebruikt bij het bestuderen van de expressie van *Hcr9* genen. Er is aangetoond dat twee van de drie *Hcr9* genen in het *Orion* cluster daadwerkelijk in de plant tot expressie komen.

Transiënte expressie in *Nicotiana* soorten en complementatie-analyse in tomaat is toegepast om de betrokkenheid van de drie *Cf-Ecp2* kandidaatgenen bij de herkenning van *Ecp2* te analyseren. Ondanks het feit dat alle gangbare functionele methoden zijn gebruikt, is het

niet mogelijk gebleken om het *Cf-Ecp2* resistentiegen aan te tonen. Op basis van de verschillende resultaten moet geconcludeerd worden dat er naast één van de drie *Orion Hcr9* genen nog een andere factor betrokken is bij de herkenning van *Ecp2* en de daaraan gekoppelde resistentie.

## Elicitorherkenning in nietwaardplanten

*C. fulvum* is een pathogeen van tomaat dat uitsluitend in de intercellulaire ruimtes van bladeren groeit. Herkenning van elicitorwitten door de plant leidt tot een overgevoeligheidsreactie en resistentie. Specifieke herkenning van *Ecp2* wordt ook gevonden in *Nicotiana paniculata*, *N. sylvestris*, *N. tabacum* en *N. undulata*. Deze planten zijn echter geen gastheer voor *C. fulvum* (nietwaardplanten). De specifieke herkenning van *Ecp2* is daarom opmerkelijk. Afwezigheid van *Ecp2* herkenning in *Nicotiana* soorten leidt niet tot infectiemogelijkheden voor *C. fulvum*. Er is aangetoond dat een enkelvoudig dominant gen betrokken is bij de specifieke herkenning van *Ecp2*. Dit gen is echter niet verwant aan de resistentiegenen tegen *C. fulvum* van tomaat.

## Elicitor variatie in Cladosporium fulvum

Uitgebreide analyse van *Avr* elicitorwitten van *C. fulvum* heeft in het verleden aangetoond dat het omzeilen van herkenning door de plant wordt veroorzaakt door DNA mutaties in de *Avr* elicitorgenen. De hoge frequentie van mutaties is hoogst waarschijnlijk veroorzaakt door een hoge selectiedruk als gevolg van het gebruik van corresponderende resistentiegenen in de commerciële tomatenverede-

ling. De *Cf-Ecp* resistentiegenen zijn echter niet of nauwelijks gebruikt in de veredeling en onderzoek heeft in het verleden aangetoond dat er weinig of geen variatie aanwezig is in de corresponderende *Ecp* elicitorgenen. De *EcoTILLING* mutatie detectie methode is gebruikt om de sequentievariatie in de geconserveerde ribosomale genen en variabele tussenliggende gebieden te vergelijken met de variatie die aanwezig is in *Avr* en *Ecp* elicitors in isolaten van *C. fulvum* uit een wereldwijde collectie. De ribosomale genen en de tussenliggende gebieden zijn volledig geconserveerd. Niet-effectieve mutaties komen soms voor in *Avr* genen. Mutaties die geassocieerd zijn met het omzeilen van herkenning door de plant, wat resulteert in het doorbreken van resistentie, komen daarentegen veelvuldig voor in *Avr* genen. In *Ecp* genen komen mutaties ook voor, echter veel minder vaak dan bij de *Avr* elicitors. Deze mutaties hebben geen effect op het doorbreken van resistentie. De resultaten tonen een zeer hoge mutatiefrequentie aan in elicitorwitten en bevestigen dat er op de *Ecp* genen geen of weinig selectiedruk is als gevolg van het kleinschalige gebruik van *Cf-Ecp* resistentiegenen in de tomatenveredeling.

## Conclusie

De resultaten van dit promotieonderzoek vormen een wetenschappelijke basis voor verdere bestudering van de co-evolutie tussen planten en pathogenen en maken een voorzichtige voorspelling van de duurzaamheid van resistentiegenen mogelijk. In de nabije toekomst zal verder uitgezocht worden welk van de drie *Orion Hcr9* genen het functionele *Cf-Ecp2* resistentiegen is.