

## Met hagel op aardappels schieten

Hendrik Rietman

Op 20 juni 2011 promoveerde Hendrik Rietman aan Wageningen University (WUR) op zijn proefschrift getiteld: “*Putting the Phytophthora infestans genome sequence at work; multiple novel avirulence and potato resistance gene candidates revealed*”. Zijn promotor, Prof. Dr. Richard G. F. Visser, en co-promotor, Dr. Ir. Vivianne G. A. A. Vleeshouwers, zijn beiden verbonden aan de leerstoelgroep Plantenveredeling van de WUR, waar ook het onderzoek werd uitgevoerd. Tevens is er samengewerkt met de leerstoelgroep Fytopathologie (WUR), het Sainsbury Lab en het James Hutton Instituut (beiden gevestigd in het Verenigd Koninkrijk). Financiering was afkomstig van het ‘Parapluplan *Phytophthora*’ en WUR Plantenveredeling.

### De aardappelziekte, al meer dan 150 jaar een probleem ...

Een hele aardappeloogst kan binnen een paar dagen weggevaagd worden door de aardappelziekte, veroorzaakt door *Phytophthora infestans*. Het probleem treedt wereldwijd al ruim 150 jaar op. Als noodmiddel wordt er veel met chemicaliën gespoten. En tóch bestaat de aardappel nog op deze planeet.

### Een probleem, maar niet in het gebied van oorsprong

Een antwoord op deze vraag vinden we in Midden- en Zuid-Amerika, waar de aardappel en haar ziekte al sinds mensenheugenis samen te vinden zijn. De introductie van *P. infestans* in Noord-Amerika en Europa, in het midden van de 18<sup>e</sup> eeuw, viel samen met veel expeditie naar o.a. Mexico, het oorsprongsgebied van de aardappelziekte. Van hieruit werden nieuw ontdekte plantensoorten opgestuurd naar o.a. de botanische tuinen in het Verenigd Koninkrijk. Het viel Engelse onderzoekers op dat sommige wilde aardappels zonder enige moeite de aardappelziekte overleefden, terwijl hun buurplanten volledig aangetast werden. Vergelijkbare voorbeelden zijn bekend uit continentaal Europa. Zo werd een zoektocht naar bruikbare wilde voorouders van de aardappel voor resistentieverdeling geboren.

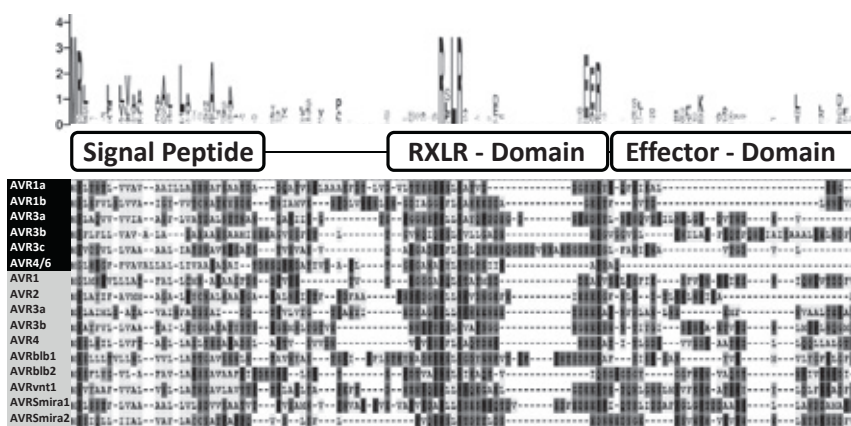
Na vele expeditie en langdurig taxonomisch onderzoek, zijn er tegenwoordig tegen de 200 wilde aardappelsoorten geïdentificeerd. Het merendeel van de soorten is extreem gevoelig voor de aardappelziekte, maar de soorten die voorkomen in de oorsprongsgebieden van *P. infestans* (Mexico, Bolivia en omstreken) zijn wisselend resistent.

### Stapje voor stapje beginnen we het te begrijpen

Onderzoek uit het afgelopen decennium heeft een schat aan informatie opgeleverd en nu is bekend dat resistentie wordt veroorzaakt door zogenaamde resistentie (R-) eiwitten. Deze R-eiwitten monitoren de aanwezigheid van *P. infestans* en zijn in staat om specifieke (AVR-) eiwitten van de indringer te herkennen. Bij herkenning worden de door *P. infestans* aangevallen cellen binnen no-time geamputeerd (door een celdoodreactie) en stopt de infectie, aangezien *P. infestans* levende cellen nodig heeft tijdens deze vroege infectiefase.

De eerste AVR-eiwitten van *Phytophthora* en andere soorten (plantenpathogenen uit de klasse van Oömyceten) werden een paar jaar geleden ontdekt, wat vergelijking van de eiwitten onderling mogelijk maakte. Zo op het eerste oog verschilden de eiwitten veel van elkaar op een signaalpeptide (een eiwit signaal dat voor uitscheiding zorgt) na. Echter, al snel werd duidelijk dat alle bekende AVR-eiwitten, een specifieke aminozuurvolgorde geconserveerd hadden, namelijk RXLR (zie figuur 1). Door middel van dit motief zijn de eiwitten in staat om een aardappelcel binnen te dringen.

Om te weten hoeveel RXLR-eiwitten *P. infestans* kan produceren, is er onlangs een zoektocht opgezet op basis van het signaal- en RXLR-peptide in het ontrafelde genoom van de ziekteverwekker. Maar liefst 560 (!) potentiële kandidaten werden geïdentificeerd. Een kleine 100 daarvan is tijdens de beginfase van het infectieproces uiterst actief, zo bleek uit expressiestudies (Haas, Kamoun *et al.* 2009). Deze, en RXLR-eiwitten die minder sterk tot expressie kwamen, zijn tijdens de loop van het promotietraject uit *P. infestans* geïsoleerd (270 in totaal).



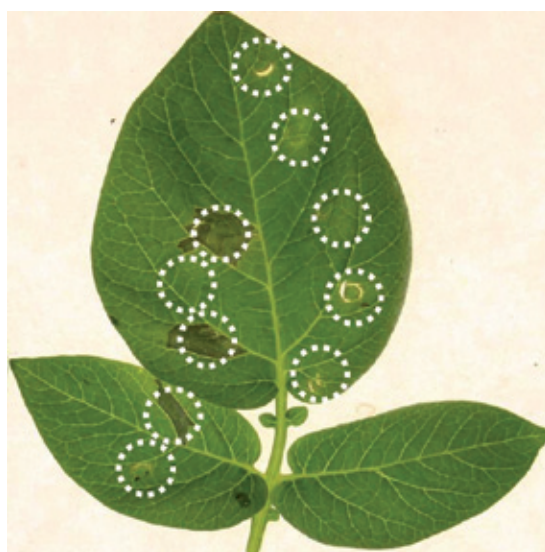
Figuur 1. Grafische weergave van op dit moment bekende AVR-eiwitten uit *Phytophthora sojae* (zwarte achtergrond) en *Phytophthora infestans* (grijze achtergrond).

Alle tot nu toe bekende AVR-eiwitten worden gekarakteriseerd door een signaalpeptide (nodig voor uitscheiding uit *Phytophthora*), een RXLR-domein (nodig voor opname in de aardappelcel) en een effector-domein (nodig voor het slagen van een infectie bij afwezigheid van het bijbehorende R-gen).

### Het resistentietrucje is makkelijk na te bootsen

De celdoodreactie die de aardappel gebruikt om *P. infestans* buiten de deur te houden is prachtig te visualiseren door geïsoleerde AVR-genen in een paar cm<sup>2</sup> aardappelblad (met het bijbehorende R-gen) in te 'spuiten' (figuur 2). Op deze manier gaan in plaats van een paar cellen, honderden cellen dood, wat makkelijk met het blote oog waar te nemen is.

Omdat er zoveel wilde aardappelsoorten zijn met verschillende niveaus van (fysio-specifieke) resistentie en alle op dit moment bekende resistenties gebaseerd zijn op herkenning van RXLR-eiwitten, is het interessant om te weten of andere RXLR-eiwitten ook bij resistentie betrokken zijn. Deze achterliggende gedachte is de rode draad in het proefschrift.



Figuur 2. Een R-gen-bevattend aardappelblad ingespoten met verschillende RXLR-genen, door het gen-overdragende organisme *Agrobacterium tumefaciens* als vehikel te gebruiken. Een celdoodreactie is duidelijk te zien en indicatief voor mogelijke AVR-kandidaten.

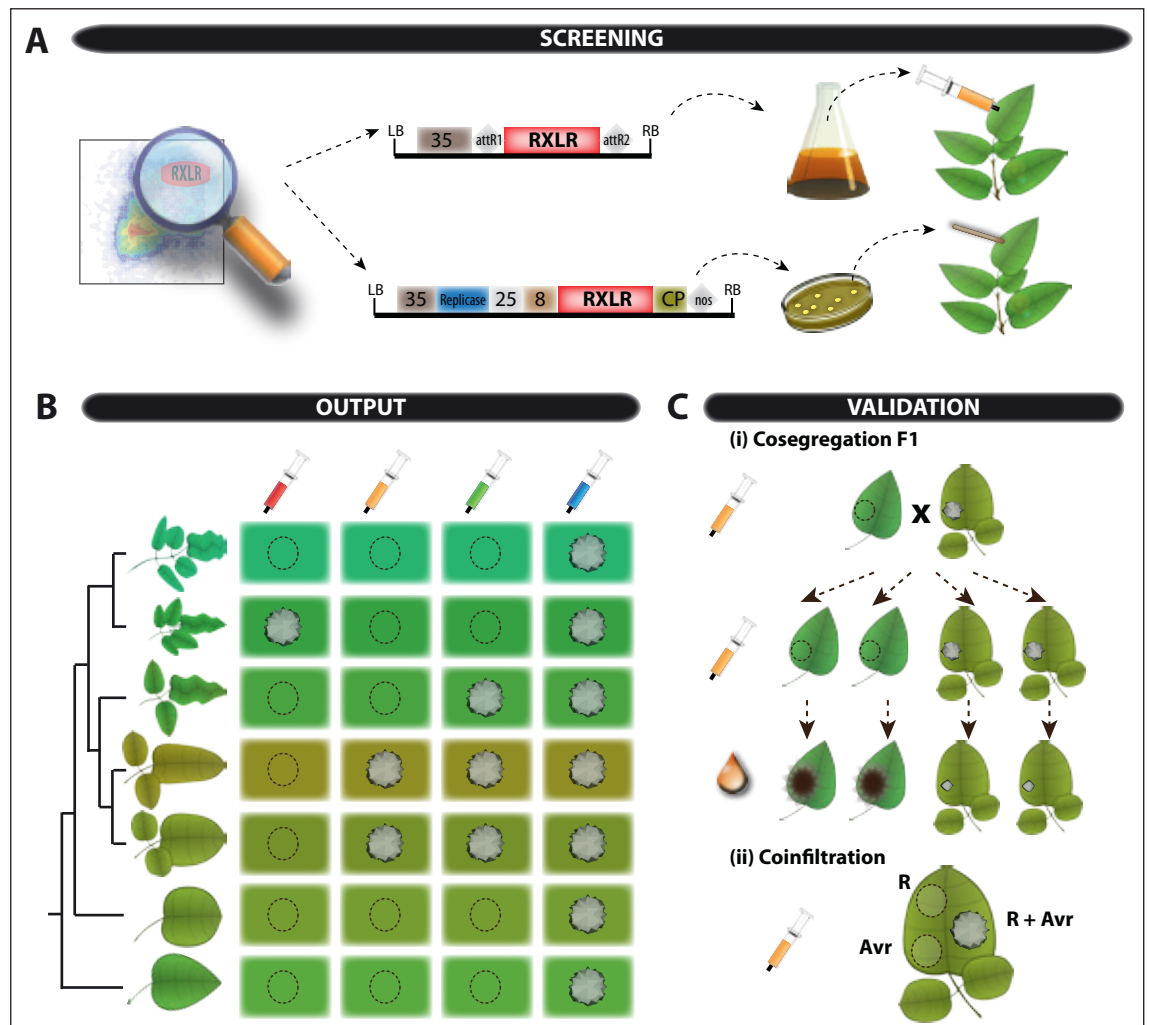
### Doelgericht met hagel schieten

In de eerste fase van het promotieonderzoek is er een zoektocht ondernomen naar unieke resistenties in wilde aardappels. Om dit te bereiken hebben we bekende Avr-genen ingebracht in >100 resistente aardappelgenotypen en gescoord op de celdood-respons. Immers, als een bekende AVR celdood induceert is de kans aanwezig dat er een bekende resistentie aanwezig is. Daarnaast zijn deze aardappels op resistentie tegen 23 diverse *P. infestans*-stammen beproefd, waarvan de reactie op bestaande R-eiwitten bekend was.

17 diverse aardappelgenotypen uit zowel Midden- als Zuid-Amerika met unieke resistenties zijn vervolgens geselecteerd en hun celdood-respons op de 270 geïsoleerde RXLR-genen is getoetst (figuur 3A & B). Uit deze veelheid aan datapunten vielen vier patronen af te leiden: 1) RXLR-eiwitten die maar in één van de 17 aardappelgenotypen celdood veroorzaakten. 2) RXLR-eiwitten die in meerdere genotypen celdood lieten zien, vaak soortspecifiek. 3) RXLR-eiwitten die in alle genotypen celdood veroorzaakten. 4) RXLR-eiwitten zonder celdood-respons. Zoals viel te verwachten gaf het merendeel van de RXLR-eiwitten geen celdood-respons. Echter, celdood-respons op zich kan natuurlijk niet één-op-één doorvertaald worden naar avirulentie. Om deze vertaalslag wel te kunnen maken zijn voor een aantal van de 17 genotypen F1-populaties gemaakt, met vatbare aardappels, die uitsplitsen voor *P. infestans*-resistentie. Vervolgens zijn de RXLR-eiwitten die celdood veroorzaakten in de resistente ouder (vaak <10 RXLR-eiwitten) getoetst in de populatie op cosegregatie van celdood met resistentie.

Via deze weg zijn er elf Avr-genen (waarvan een aantal kandidaat zijn) opgespoord. Daarnaast is ook bewijs geleverd voor het bestaan van vele, nog niet gekloneerde, R-genen in de wilde aardappel-genen-pool.

Figuur 3. De screening die tijdens de studie uitgevoerd is. A) 270 opgespoorde RXLR-genen zijn gekloneerd en via *Agrobacterium tumefaciens* (een bacterie die genen over kan brengen in de plant), ingespoten in aardappelbladeren. B) Daarna is de output bestudeerd en de mate van celdood voor iedere RXLR-plantgenotype-combinatie genoteerd (zie tekst voor uitleg). C) Vervolgens zijn F1-populaties die uitsplitsen voor *P. infestans*-resistentie getoetst op resistentie ('druppeltje') en respons op de RXLR-eiwitten ('spuitje') die in de resistente ouder celdood veroorzaakten. AVRs die cosegregeerden met resistentie worden als AVR-kandidaten aangemerkt (i), en indien geïsoleerd, tezamen mét het R-gen ingespoten in een vatbare plant: het uiteindelijke bewijs voor interactie met het R-eiwit (ii). (Figuur is eerder gepubliceerd in (Vleeshouwers, Raffaele et al. 2011)).



### Sarpo Mira: Het huzarenstukje

Sarpo Mira was tot nu toe hét mysterie onder de aardappelrassen. Het ras is namelijk geliefd onder biologische telers en één van de weinige aardappelziekeresistente rassen waarvan de resistentieachtergrond nog niet bekend was. Een ideaal slachtoffer natuurlijk om onze methode (figuur 3) eens op los te laten. Met succes.

Een F1-populatie van Sarpo Mira met een vatbare ouder, resulteerde namelijk in vier verschillende uitsplitsingspatronen voor resistentie in een laboratoriumtoets. Deze patronen konden één-op-één gelinkt worden aan vier verschillende RXLR-eiwitten, te weten: de bekende AVR3a, AVR3b en AVR4 en een nieuwe AVR-kandidaat genaamd AVRSmira1. Een heel arsenaal aan resistentiegenen dus. Later bleek dat een resistentie die niet in de laboratoriumtoets tot uiting kwam, wél op het veld werkte. Veldresistentie was namelijk te linken aan een 5<sup>e</sup> RXLR-eiwit, die AVRSmira2 genoemd is.

Het is de bedoeling dat toekomstige rassen wor-

den uitgerust met een diverse stapeling van resistenties. Hierdoor wordt het *P. infestans* moeilijker gemaakt om de plant aan te tasten. Kennis over de moleculaire basis van de resistenties (welke RXLR-eiwitten zetten het resistentiemechanisme aan?) is hierbij van essentieel belang om, bijvoorbeeld, mogelijke resistentiedoorbraken voor te zijn door veldisolaten te monitoren op aan- dan wel afwezigheid van het avirulentie-eiwit.

Hendrik Rietman is bereikbaar via [hendrik@rietman.nu](mailto:hendrik@rietman.nu). Het aardappelziekte-onderzoek wordt aangestuurd door Dr. Ir. Vivianne Vleeshouwers, bereikbaar via [vivianne.vleeshouwers@wur.nl](mailto:vivianne.vleeshouwers@wur.nl).

### Referenties

- Haas BJ, Kamoun S, et al. (2009) Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* 461(7262): 393-398.
- Vleeshouwers VGAA, Raffaele S, et al. (2011) Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors. *Annual Review of Phytopathology* 49: 507-531.