

# Engineering disease resistance in plants

Jerôme Custers

Op 8 januari 2007 promoveerde Jerôme Custers aan Wageningen Universiteit op het proefschrift getiteld "Engineering disease resistance in plants". Promotor was Prof. Dr. Ir. P.J.G.M. de Wit, verbonden aan de leerstoelgroep Fytopathologie, Wageningen Universiteit. Co-promotor was Dr. M.H. Stuiver, Head of Genomics, BASF Plant Science GmbH, Limburgerhof, Duitsland. Het werk beschreven in dit proefschrift werd uitgevoerd bij Syngenta Mogen B.V. (voorheen MOGEN International N.V.) in Leiden. Het onderzoek is gefinancierd door Syngenta.

## Inleiding

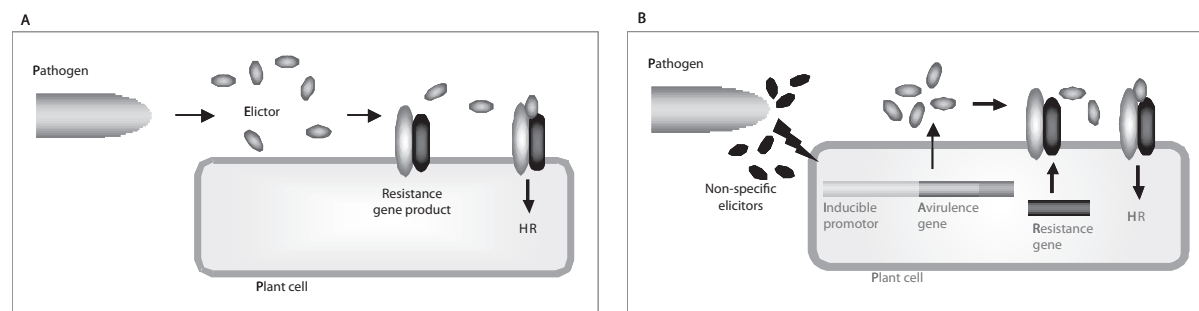
Ondanks inspanningen van een groot aantal bedrijven

en instituten is men er tot op heden niet in geslaagd gewassen op de markt te brengen met een verbeterde resistentie tegen plantenpathogene bacteriën of schimmels. De enorme complexiteit van de moleculaire basis van ziekteresistentie in planten heeft geleid tot aanzienlijke vertraging van marktintroductie van genetisch gemodificeerde gewassen. Een gedegen inzicht in de interactie tussen de gastheer en het plantenpathogeen is essentieel om gewassen te ontwikkelen met een verbeterde afweer tegen ziekteverwekkende micro-organismen. De meeste strategieën zijn gebaseerd op planteigen afweersystemen. Een aantal van deze methoden om ziekteresistentie in te bouwen in landbouwgewassen is in de praktijk getest en geëvalueerd. Hoewel er in een aantal geval-

len veelbelovende resistentieniveaus werden behaald waren de agronomische eigenschappen van de transgene planten vaak teleurstellend. Dit werd vaak veroorzaakt door de relatief hoge en slecht gereguleerde expressie van de geïntroduceerde genen, resulterend in negatieve effecten op ontwikkeling van de plant en uiteindelijk opbrengst.

Recente ontwikkelingen op het gebied van de ontrafeling van de moleculaire fundamenteën van ziekteresistentie in planten maken de weg vrij voor de ontwikkeling van gewassen met verhoogde ziekteresistentie met behulp van genetische modificatie met behoudt van belangrijke eigenschappen zoals groei en opbrengst.

In het algemeen is ziekteresistentie in planten opgebouwd



Figuur 1. Toepassing van gen-om-gen resistentie om resistentie te genereren tegen een breed scala aan pathogenen. **A.** Situatie in de natuur waarbij het avirulentie-eiwit, dat geproduceerd wordt door het pathogeen, wordt herkend door een resistentiegeenproduct in de plant. De herkenning activeert de hypersensitieve respons (HR) die er voor zorgt dat de groei van het pathogeen beperkt of gestopt wordt. **B.** Het avirulentie-gen wordt met behulp van genetische modificatie ingebracht in de plant en geplaatst onder transcriptionele controle van een pathogeen-induceerbare promotor. Deze pathogeen-induceerbare promotor kan geactiveerd worden door een groot aantal pathogenen. Als een pathogeen de plant infecteert, wordt hierdoor de pathogeen-induceerbare promotor aangeschakeld waardoor het avirulentie-eiwit geproduceerd wordt door de plant. Vervolgens wordt het avirulentie-eiwit herkend door het resistentie-eiwit. In de meeste gevallen is er minstens nog een derde component nodig (een virulentie target) die betrokken is bij de indirecte herkenning van het avirulentie-eiwit.

PROMOTIES

# PROMOTIES

uit meerdere verdedigingslagen die gezamenlijk in staat zijn het merendeel van de potentiële ziekteverwekkers te weerstaan. In eerste instantie wordt een groot aantal potentiële ziekteverwekkers al gestopt door constitutief aanwezige barrières bestaande uit fysieke obstakels en de aanwezigheid van gevormde antimicrobiële componenten. Geïnduceerde resistentie is meestal de laatste verdedigingslinie. In deze fase maken planten gebruik van een actief verdedigingsmechanisme om pathoogeeninfectie te weerstaan. Deze actieve afweervormen zijn gebaseerd op specifieke herkenningsmechanismen en zijn zeer verfijnd en effectief. Een karakteristieke vorm van geïnduceerde resistentie is de hypersensitieve respons (HR). Deze wordt gekenmerkt door de dood van een kleine groep cellen op de plaats van infectie. Gelijkijdig wordt er een cascade van afweerreacties in gang gezet, zowel lokaal, direct rond de plaats van infectie, als ook in andere delen van de plant. In het geval van gen-gen-interacties zijn resistentiegenen van planten in staat om resistentie te bewerkstelligen tegen ziekteverwekkers die het bijpassende avirulentie-gen dragen.

De ideale strategie om de afweer van planten te verbeteren is een methode die werkzaam is tegen een breed scala van pathogenen en niet actief is als er geen pathogenen aanwezig zijn waardoor er geen negatief effect op de groei en ontwikkeling van de plant is. Een strategie die gevolgd is bij Syngenta Mogen is gebaseerd op de pathoogeen-geïnduceerde expressie van een avirulentie-eiwit, afkomstig van een plantpathoogeen, waardoor de HR geactiveerd wordt (Figuur

1). Om deze methode succesvol toe te passen in landbouwgewassen is de pathoogeen-induceerbare promoter van groot belang. Deze strikt gereguleerde pathoogeen-induceerbare promoter moet ervoor zorgen dat de HR op de juiste plaats en op het juiste moment geactiveerd wordt. De karakteristieken van het avirulentie-eiwit bepalen aan welke voorwaarden een pathoogeen-induceerbare promoter moet voldoen. Bijvoorbeeld, wat mag het basis-expressieniveau zijn om geen negatief effect op de plant te veroorzaken en wat moet het minimale inductieniveau zijn om een HR te induceren?

## Identificatie en testen van pathoogeen-induceerbare promoters

Pathoogeen-induceerbare promoters kunnen op verschillende manieren geïdentificeerd worden. Klassieke methoden zoals T-DNA-markering en het isoleren van promoters van pathoogeen-actieveerbare genen kunnen kandidaten opleveren die geschikt zijn voor toepassingen zoals hierboven beschreven. Daarnaast hebben de laatste jaren relatief jonge technologieën zoals cDNA-AFLP en het gebruik van DNA-arrays geresulteerd in een versnelling van de identificatie van genen die aangeschakeld worden door plantpathogenen. De corresponderende promoters kunnen dan geïsoleerd en vervolgens getest worden in de gewenste plantensoort. In dit proefschrift staan drie nieuwe pathoogeen-induceerbare promoters beschreven. Hun functioneren in transgene planten is geanalyseerd met behulp van het reportergen coderend voor het enzym  $\beta$ -glucuronidase (*UidA*).

T-DNA-markeringsexperimenten in het modelgewas *Arabidopsis thaliana* hebben geleid tot de identificatie van een promoter die lokaal geactiveerd wordt door de schimmel *Botrytis cinerea*. Deze pathoogeen-induceerbare promoter werd gevonden in een *Arabidopsis*-T-DNA-bank van 1500 transgene lijnen die getransformeerd waren met een reportergenconstruct zonder promoter. De promoter is geïsoleerd, opnieuw gefuseerd aan het *UidA*-gen en getransformeerd naar *Arabidopsis thaliana*. Uitgebreide analyse van de transgene *Arabidopsis*-planten gaf aan dat een fragment van 1800 baseparen (bp) de pathoogeen-induceerbare activiteit bewaard had (Figuur 2). Deze promoter, afkomstig uit *A. thaliana* bleek ook functioneel te zijn in koolzaad (*Brassica napus* c.v. Westar). Verdere karakterisering van de T-DNA-markeringlijn resulteerde in de identificatie van een kinasegen dat gekoppeld bleek te zijn aan deze promoter, maar dan in omgekeerde oriëntatie. Dit kinasegen bleek in *Arabidopsis* vergelijkbare expressiekarakteristieken te hebben als de promoter.

Twee andere pathoogeen-induceerbare promoters werden geïsoleerd uit respectievelijk zonnebloem (*Helianthus annuus*) en maagdenpalm (*Catharanthus roseus*). De promoter uit zonnebloem, behorende bij het koolhydraatoxidasegen, is geïsoleerd omdat het koolhydraatoxidasegen in zonnebloem lokaal geactiveerd wordt na infectie door een drietal schimmels. De promoter uit maagdenpalm, behorende bij het isochorismatesynthasegen, is geïsoleerd omdat isochorismatesynthase een rol speelt bij de synthese van salicylzuur na pathoogeeninfectie en omdat

RT-PCR-experimenten hebben laten zien dat het gen lokaal geactiveerd wordt na schimmelinfectie. Deze twee promoters zijn ook gekoppeld aan het *Uida*-reportergen. Vervolgens werden transgene aardappelplanten gegenereerd met deze promoter-reportergenconstructen. De eigenschappen van deze twee nieuwe promoters werden vergeleken met twee bekende promoters geïsoleerd van *Vitis*-stilbenesynthase (*Vst1*) en aardappelglutathion-S-transferase (*Gst1*). Van elke promoter-reportergenfusie zijn twintig transgene aardappellijnen gegenereerd en geanalyseerd met behulp van conventionele histochemische kleuringstechnieken en *real time* (RT) PCR-analyse om de eigenschappen van de promoters te bepalen. Er is aangetoond dat alle promoter-reportergenfusies werden geactiveerd in aardappel door *Phytophthora infestans*, een oomyceet-pathogeen die een van de meest problematische ziektes in de aardappelteelt

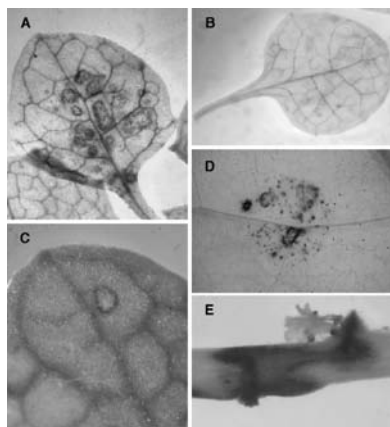
veroorzaakt. De promoters vertoonden verschillende pathogeen-induceerbare expressiepatronen met betrekking tot plaats, snelheid, niveau en frequentie van activering: zo had de isochorismatesynthasepromoter een laag basisniveau van expressie, zowel op RNA- als eiwitniveau. De koolhydraatoxidasepromoter uit zonnebloem liet geen detecteerbare GUS-expressie zien in de histochemische analyses maar liet wel induceerbare expressie zien in de RT-PCR experimenten.

Bovenstaande experimenten hebben inzicht gegeven in de karakteristieken van 3 pathogeen-induceerbare promoters. De analyse van expressieniveaus zowel voor als na infectie geeft informatie over de dynamiek van een promoter. Analyse van expressie over de tijd leert ons iets over de reactiesnelheid van een promoter. In de praktijk blijkt het moeilijk om geschikte pathogeen-induceerbare promoters te vinden. De in de natuur voorkomende promoters hebben bijna allemaal een of meerdere nadelen zoals een beperkte toepasbaarheid buiten het gewas van oorsprong of activering door andere stimuli zoals verwonding of droogte. Het is gebleken dat pathogeen-induceerbaarheid en bijvoorbeeld wond-induceerbaarheid wel los te koppelen zijn. Uitgebreide kennis van de transcriptiefactoren die betrokken zijn bij de activering

van pathogeen-induceerbare promoters en de *cis*-elementen waaraan ze binden kunnen ons helpen om bestaande pathogeen-induceerbare promoters te verbeteren of zelfs om synthetische promoters te ontwerpen met de gewenste eigenschappen.

### ***Avr9* transcriptionele respons in aardappel**

Plantpathogenen produceren eiwitten die gebruikt worden om de infectie van de gastheer te bevorderen. Deze virulentie-eiwitten hebben een of meerdere *targets* in de plant waardoor ze hun virulentiebevorderende functie kunnen uitvoeren. De plant maakt op zijn beurt resistentie-eiwitten die de virulentiefactor direct herkennen of veranderingen aan de virulentie-*target* herkennen. Een avirulentie-eiwit heeft dus naar alle waarschijnlijkheid een virulentiefunctie om het infectieproces van het pathogeen te bevorderen. Dat kan door het beïnvloeden van de afweerreacties van de plant, manipulatie van het metabolisme van de plant of bijvoorbeeld door celdood te remmen. *Avr9* is een avirulentie-eiwit van de schimmel *Cladosporium fulvum*, een pathogeen op tomaat. Dit eiwit veroorzaakt een HR als in de gastheer het resistentiegen *Cf-9* aanwezig is. Deze reactie kan ook plaatsvinden in andere leden van de *Solanaceae*, zoals



**Figuur 2.** Histochemische kleuring van GUS-activiteit in transgene *Arabidopsis thaliana*- en *Brassica napus*-planten. *Arabidopsis*-planten werden geïnfecteerd met *Botrytis cinerea* en *Brassica napus* planten werden geïnfecteerd met *Phoma lingam*. **A.** oorspronkelijke *Arabidopsis* T-DNA markeringslijn 488. Er is duidelijke GUS-activiteit te zien rondom de necrotische gebieden als gevolg van de *Botrytis*-infectie. **B.** GUS-activiteit in een blad van de *Arabidopsis*-T-DNA markeringslijn 488, behandeld met 5 mM salicylzuur. **C.** Transgene *Arabidopsis*-lijn getransformeerd met de geïsoleerde promoter van 1800 bp. De GUS-activiteit rondom de door *Botrytis* aangetaste gebieden is duidelijk zichtbaar. **D.** Detailopname van GUS-blauwkleuring in een necrotisch gebied veroorzaakt door *Phoma lingam* op het blad van een transgene *Brassica napus*-plant, getransformeerd met de 1800 bp 488 promoter. **E.** GUS-kleuring rondom *Phoma lingam*-aantastingen in de stengel van een transgene *B. napus*-plant.

# PROMOTIES

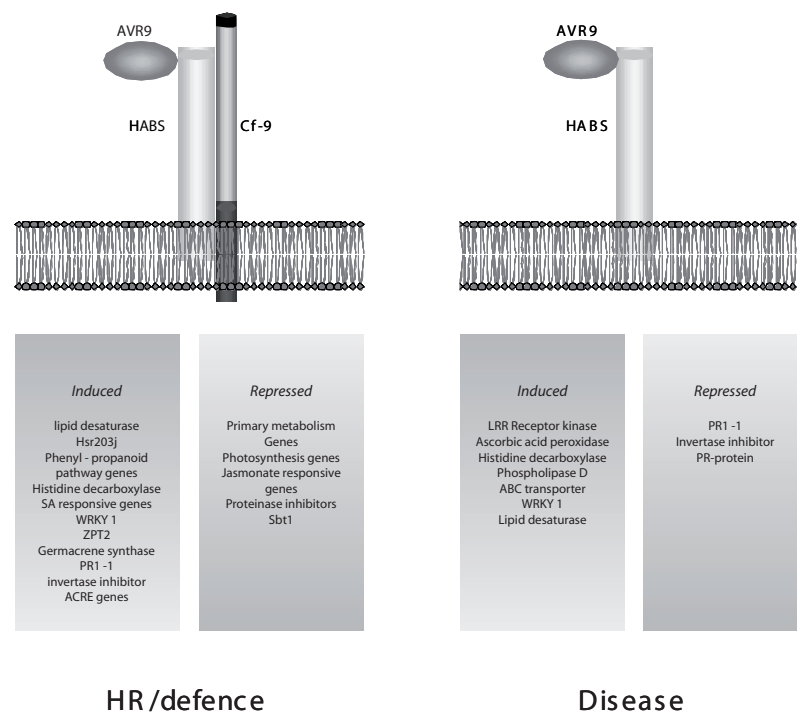
aardappel, wanneer het *Cf-9* resistentiegen daar geïntroduceerd wordt. Om inzicht te krijgen in de basis van de HR in aardappel, als gevolg van een interactie tussen Avr9 en *Cf-9*, werden aardappelplanten onderzocht op transcriptionele veranderingen als gevolg van het toedienen van het Avr9-eiwit. Verschillende expressie-typeringsexperimenten zijn gedaan met behulp van cDNA-microarrays om het expressieprofiel van ongeveer 10.000 genen in bladeren van aardappelplanten te volgen als gevolg van deze Avr9 toediening. Het Avr9-eiwit werd handmatig geïnfiltreerd in bladeren van aardappelplanten die het complementaire resistentiegen *Cf-9* bevatten en in bladeren van aardappelplanten die dit resistentiegen niet bevatten. Monsters werden genomen op verschillende tijdstippen om

de kinetiek van de Avr9-respons in aardappel te volgen. Tenminste 510 aardappelgenen bleken te reageren op Avr9-infiltratie. Deze genen zijn STAR-genen genoemd (*Solanum tuberosum* Avr9 Responsive). Grote transcriptionele veranderingen werden waargenomen na infiltratie van Avr9 in planten die *Cf-9* tot expressie brengen. Gelijktijdig met een sterke inductie van genen die verband houden met afweer en stress, zagen we dat genen die betrokken zijn bij algemeen metabolisme en fotosynthese omlaag gingen in expressie. Ook zijn een aantal genen geïdentificeerd die nog niet eerder met de HR of de plantafweer in verband zijn gebracht zoals histidine decarboxylases; enzymen die als eindproducten kooldioxide en histamine hebben. Een beperkt aantal genen veranderde van

expressieniveau na toediening van Avr9 aan niet-getransformeerde aardappelplanten. De resultaten suggereren dat Avr9 betrokken kan zijn bij het beïnvloeden van de afweerreactie van de plant.

## Conclusies en vooruitblik

Hoewel er de laatste jaren een groot aantal nieuwe componenten is geïdentificeerd die een rol spelen bij de afweer van de plant en de regulatie van ziekteresistentie in planten is het nog niet gelukt deze succesvol toe te passen in de praktijk. Het is duidelijk dat promotors, en in het bijzonder, pathogeen-induceerbare promotors van groot belang zijn om transgene planten te ontwikkelen die een verbeterde resistentie hebben tegen microbiële ziekteverwekkers. De promotors beschreven in dit proefschrift zullen bruikbare alternatieven zijn voor de tot op heden beschikbare promotors en kunnen als blauwdruk dienen voor de ontwikkeling van nieuwe pathogeen-induceerbare promotors met de gewenste eigenschappen. De analyse van de transcriptionele veranderingen als gevolg van avirulentie-eiwit Avr9 in aardappelplanten draagt bij aan ons begrip van de mechanismen die planten gebruiken om microbiële pathogenen te herkennen en af te weren en de mechanismen die pathogenen op hun beurt kunnen gebruiken om de plant te beïnvloeden. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift heeft nieuwe componenten, methoden en inzichten opgeleverd die kunnen bijdragen aan de kwaliteit en werkzaamheid van genetisch gemodificeerde gewassen met verhoogde resistentie tegen microbiële ziekteverwekkers.



Figuur 3. Schematische weergave van de transcriptionele respons in aardappel als gevolg van de herkenning van Avr9 door Cf-9 (HABS = High Affinity Binding Site, derde component nodig om Avr9 te herkennen). In het figuur zijn verkorte lijsten weergegeven van genen waarvan de expressie geïnduceerd dan wel onderdrukt werd in de verschillende behandelingen.