# De zoete vruchten van het onderzoek aan Fusarium verwelkingsziekte in Amsterdam

*Martijn Rep & Frank Takken*

*Fytopathologie (Molecular Plant Pathology), Universiteit van Amsterdam*

## Inleiding

Nadat Ben Cornelissen in 1992 werd aangesteld als hoogleraar Fytopathologie aan de Universiteit van Amsterdam koos hij de interactie tussen de bodemschimmel *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) en tomaat als modelsysteem voor fytopathologisch onderzoek in Amsterdam. De eerste avirulentiefactor van een schimmel – Avr9 van *Cladosporium fulvum* – was een jaar eerder geïdentificeerd door de groep van Pierre de Wit in Wageningen (van Kan et al. 1991). Het bestaan van dominante resistentie (R) genen in tomaat (*I*, *I-2* en *I-3*) tegen Fusarium verwelkingsziekte – en de aanwezigheid van corresponderende fysio's in Fol – deed het vermoeden rijzen dat resistentie tegen Fol ook gebaseerd is op de herkenning van dergelijke avirulentie-eiwitten (Avr's). Deze Avr's zouden dan door Fol in de plant uitgescheiden worden, waarna ze door het resistentiegenproduct herkend kunnen worden. De zoektocht naar tomaat resistentiegenen en Fol avirulentiegenen ging van start.

## Identificatie van het eerste R gen tegen een bodemschimmel

Het eerste succes was de identificatie, in samenwerking met het bedrijf KeyGene, van het eerste R gen dat bescherming geeft tegen een wortelinfecterend pathogeen: *I-2* tegen Fol (Simons et al., 1998). Dit gen codeert voor een intracellulaire immuunreceptor van het Nucleotide-binding Leucine-rich repeat Receptor (NLR) type, wat impliceerde dat Avr2 door de plantencel wordt opgenomen. Verder onderzoek aan de I-2 immuunreceptor in Amsterdam heeft aangetoond dat uitwisseling van ADP voor ATP de receptor activeert en daarmee immuniteit induceert (Tameling et al., 2002). Dit werkingsprincipe blijkt ook van toepassing op andere NLR-type immuunreceptoren en heeft geleid tot een baanbrekend model van de werking van dit type eiwitten (Takken & Tameling, 2009).

## Gen-om-gen in het xyleem

Fol stammen kunnen niet worden gekruist wat de zoektocht naar avirulentiegenen bemoeilijkt. De groep liet zich hierdoor echter niet uit het veld slaan en de eerste poging om avirulentiegenen in Fol te identificeren was door het uitvoeren van parasexuele kruisingen met behulp van protoplastfusie. Een veel en variabel voorkomend transposon, Foxy, werd gebruikt als genetische merker voor het maken van een genetische kaart. Dit werk leidde tot de eerste genetische kaart van *Fusarium oxysporum* (Fo), maar helaas niet tot het kloneren van een avirulentiegen (Teunissen et al., 2003).

Uiteindelijk werden de drie avirulentiefactoren, die corresponderen met de resistentiegenen *I*, *I-2* en *I-3*, geïdentificeerd met behulp van massaspectrometrie van eiwitten in xyleemsap van met Fol geïnfecteerde tomatenplanten (Houterman et al., 2007) (Tabel 1). De eerste Avr was Avr3, ook bekend als Six1 (Secreted in xylem 1) (Rep et al., 2004). Vervolgens werd aangetoond dat Six4 wordt herkend door I en Six3 door I-2, die vervolgens werden hernoemd tot Avr1 (=Six4) en Avr2 (=Six3) (Houterman et al., 2008; Houterman et al., 2009). Recentelijk zijn I en I-3 door de groep van David Jones gekloneerd en deze blijken te coderen voor extracellulaire immuunreceptoren gelokaliseerd op de plasmamembraan van de plantencel (respectievelijk een receptor-like protein (RLP) en een S-receptor-like kinase (SRLK)) (Catanzariti et al., 2017; Catanzariti et al., 2015). Hiermee waren de drie 'gen-om-gen' paren voor de tomaat-Fol interactie compleet. Jones' groep heeft recent in tomaat ook nog een vierde *R* gen tegen Fol gevonden, *I-7*, welke codeert voor een RLP waarvoor

*Tabel 1: Resistentie (R) genen in tomaat tegen* Fusarium *verwelkingsziekte.*

| R gen | Ingekruist vanuit | Type | Avirulentiefactor | Alternatieve naam |
|---|---|---|---|---|
| *I* | *Solanum pimpinellifolium* | RLP | Avr1 | Six4 |
| *I-2* | *Solanum pimpinellifolium* | NB-LRR | Avr2 | Six3 |
| *I-3* | *Solanum pennellii* | SRLK | Avr3 | Six1 |
| *I-7* | *Solanum pennellii* | RLP | onbekend | |

*Tabel 2: Fysio's van Fol, avirulentiegenen en resistentie in tomaat.*

| Fysio | Avirulentiegenen | | | Resistentie door |
|---|---|---|---|---|
| 1 | *AVR1* | *AVR2* | *AVR3* | *I* (*I-2* and *I-3* worden onderdrukt) |
| 2 | - | *AVR2* | *AVR3* | *I-2* en *I-3* |
| 3 | - | *avr2* * | *AVR3* | *I-3* |

** Fysio 3 isolaten hebben puntmutaties in Avr2 waardoor geen herkenning door I-2 plaatsvindt.*

de avirulentiefactor nog niet bekend is (Tabel 1). Het doorbreken van I-gemedieerde resistentie (het ontstaan van Fol fysio 2 uit fysio 1) bleek een gevolg van deleties van het *AVR1/SIX4* locus, terwijl I-2-gemedieerde resistentie (het ontstaan van Fol fysio 3 uit fysio 2) doorbroken werd door de verandering van één specifiek aminozuur in Avr2/Six3, waarbij het eiwit en haar functie behouden blijft (Houterman et al., 2009; Biju et al., 2017). Ook bleek resistentie gemedieerd door I-2 of I-3 te kunnen worden onderdrukt door Avr1 (Houterman et al., 2008) (Tabel 2).

## Een pathogeniteitschromosoom

In 2008 werd de DNA genoomsequentie van een Fol isolaat bepaald door het Broad Institute. Hierdoor kon worden vastgesteld dat de genen coderend voor de 14 Six eiwitten aanwezig in xyleemsap van Fol geïnfecteerde tomatenplanten (Schmidt et al., 2013) zich allemaal bevinden op één van de 15 chromosomen van dat isolaat. In Amsterdam werd vervolgens experimenteel de horizontale overdracht van dit 'pathogeniteits-chromosoom' naar een niet-pathogeen aangetoond, waarbij dat isolaat ook het vermogen verkreeg om tomaat te infecteren (L. J. Ma et al., 2010). Later werd aangetoond dat verlies van dit chromosoom leidt tot verlies van pathogeniteit (Vlaardingerbroek et al., 2016).

## Functie van Six eiwitten in tomaat en andere gewassen

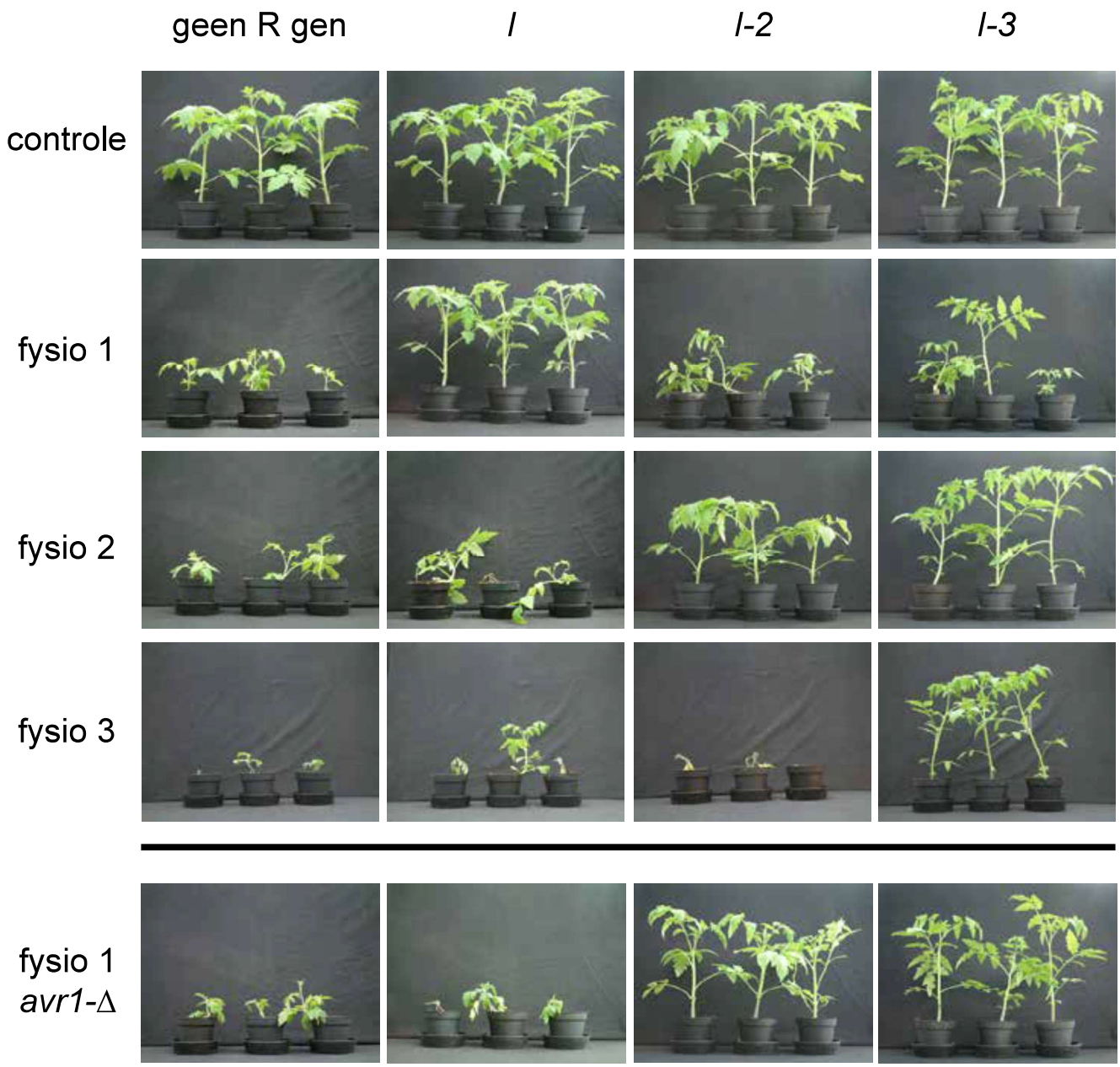
Van sommige Six eiwitten, inclusief Avr2/Six3 en Avr3/Six1, is aangetoond dat ze bijdragen aan virulentie van Fol (Rep et al,. 2004; Houterman et al., 2009). Van een homoloog van Avr3/Six1 in een banaan-infecterend isolaat (Fo f.sp. *cubense* tropical race 4) is dit, in samenwerking met de groep van prof. Gert Kema in Wageningen, nu ook aangetoond (Widinugraheni et al,. 2018). Ook is inmiddels de eerste avirulentiefactor van meloen-infecterende Fo f.sp. *melonis*, AvrFOM2, gevonden (Schmidt et al., 2016) waarvoor al eerder het bijpassende NLR resistentie-gen was geïdentificeerd (Joobeur et al., 2004).

De moleculaire functie van de Six eiwitten in de gastheer zijn grotendeels onbekend. Wel weten we dat Six5 en Avr2/Six3 een 'paar' vormen en beiden nodig zijn voor zowel virulentie als ook I-2-gemedieerde resistentie (L. Ma et al., 2015). Dit kan waarschijnlijk worden toegeschreven aan de rol van Six5 in het intercellulaire transport van Avr2 via plasmodesmata (Cao et al., 2018). Dit gebeurt na opname van Avr2 door een plantencel (L. Ma et al., 2013; Di et al., 2016), waar deze het basale plant afweersysteem onderdrukt (Di et al., 2017). Naast het verder onderzoeken van de functie van Six eiwitten en het identificeren van hun *host targets* is het onderzoek naar Fusarium verwelkingsziekte uitgebreid naar andere gewassen dan tomaat.

## Zoete vruchten

Door het analyseren van genoomsequenties van Fo isolaten behorende tot verschillende *formae speciales*[1] worden doorlopend nieuwe kandidaat-(a)virulentiegenen en pathogeniteits-chromosoom ontdekt (van Dam et al., 2016). Met deze informatie worden moleculaire toetsen ontwikkeld waarmee *formae speciales* en soms zelfs fysio's eenduidig kunnen worden geïdentificeerd (van Dam et al., 2018). Het moleculair kunnen onderscheiden van ziekteverwekkende van neutrale of zelfs gunstige en weerstandverhogende Fo isolaten is een belangrijke 'vrucht' van het onderzoek in Amsterdam. Daarnaast leidt begrip van de moleculaire basis van de interactie tussen planten en Fo tot nieuwe strategieën om de weerstand van een gewas tegen ziektes te verhogen, bijvoorbeeld door gebruik te maken van combinaties van R genen, het gericht uitschakelen van gevoeligheidsgenen of door de resistentie-inducerende activiteit van niet pathogene Fo isolaten te verhogen.

1 Een *forma specialis* ofwel gastheer-specifieke vorm is een verzameling van isolaten die ziekte veroorzaken in hetzelfde gewas




*Figuur 1: Gen-om-gen relatie tussen Fol en tomaat.*
*De drie bekende fysio's van Fol onderscheiden zich door het patroon van virulentie op tomatenlijnen met resistentiegenen I, I-2 of I-3 (zie ook tabel 2). Een mutant van fysio 1 waarin AVR1 is uitgeschakeld (fysio 1 avr1-Δ) gedraagt zich als fysio 2: virulent op I, avirulent op I-2 en I-3 lijnen, beide vanwege het verlies van Avr1.*

## Referenties

Biju, V. C., Fokkens, L., Houterman, P. M., Rep, M. & Cornelissen, B. J. (2017). Multiple evolutionary trajectories have led to the emergence of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Appl Environ Microbiol, 83*(4), doi:10.1128/AEM.02548-16.

Cao, L., Blekemolen, M. C., Tintor, N., Cornelissen, B. J. C. & Takken, F. L. W. (2018). The *Fusarium oxysporum* Avr2-Six5 effector pair alters plasmodesmatal exclusion selectivity to facilitate cell-to-cell movement of Avr2. *Mol Plant, 11*(5), 691-705, doi:10.1016/j.molp.2018.02.011.

Catanzariti, A. M., Do, H. T., Bru, P., de Sain, M., Thatcher, L. F., Rep, M. &Jones, D.A. (2017). The tomato I gene for Fusarium wilt resistance encodes an atypical leucine-rich repeat receptor-like protein whose function is nevertheless dependent on SOBIR1 and SERK3/BAK1. *Plant J, 89*(6), 1195-1209, doi:10.1111/tpj.13458.

Catanzariti, A. M., Lim, G. T. & Jones, D. A. (2015). The tomato I-3 gene: a novel gene for resistance to Fusarium wilt disease. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *New Phytologist, 207*(1), 106-118, doi:10.1111/nph.13348.

Di, X., Cao, L., Hughes, R. K., Tintor, N., Banfield, M. J. & Takken, F. L. W. (2017). Structure-function analysis of the *Fusarium oxysporum* Avr2 effector allows uncoupling of its immune-suppressing activity from recognition. *New Phytologist, 216*(3), 897-914, doi:10.1111/nph.14733.

Di, X., Takken, F. L. & Tintor, N. (2016). How phytohormones shape interactions between plants and the soil-borne fungus *Fusarium oxysporum*. [Review]. *Front Plant Sci, 7*, 170, doi:10.3389/fpls.2016.00170.

Houterman, P. M., Cornelissen, B. J. & Rep, M. (2008). Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. *PLoS Pathogens, 4*(5), e1000061.

Houterman, P. M., Ma, L., van Ooijen, G., de Vroomen, M. J., Cornelissen, B. J. C., Takken, F. L. W. & Rep, M. (2009). The effector protein Avr2 of the xylem colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *Plant Journal, 58*, 970-978.

Houterman, P. M., Speijer, D., Dekker, H. L., de Koster, C. G., Cornelissen, B. J. C., & Rep, M. (2007). The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. *Molecular Plant Pathology, 8*(2), 215-221.

Joobeur, T., King, J. J., Nolin, S. J., Thomas, C. E., & Dean, R. A. (2004). The Fusarium wilt resistance locus Fom-2 of melon contains a single resistance gene with complex features. *Plant J, 39*(3), 283-297.

Ma, L., Cornelissen, B. J., & Takken, F. L. W. (2013). A nuclear localization for Avr2 from *Fusarium oxysporum* is required to activate the tomato resistance protein I-2. *Front Plant Sci, 4*, 94, doi:10.3389/fpls.2013.00094.

Ma, L., Houterman, P. M., Gawehns, F., Cao, L., Sillo, F., Richter, H., et al. (2015). The AVR2-SIX5 gene pair is required to activate I-2-mediated immunity in tomato. *New Phytologist, 208*(2), 507-518, doi:10.1111/nph.13455.

Ma, L. J., van der Does, H. C., Borkovich, K. A., Coleman, J. J., Daboussi, M. J., Di Pietro, A., et al. (2010). Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in Fusarium. *Nature, 464*(7287), 367-373, doi:Doi 10.1038/Nature08850.

Rep, M., van der Does, H. C., Meijer, M., van Wijk, R., Houterman, P. M., Dekker, H. L., et al. (2004). A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for *I-3*-mediated resistance in tomato. *Mol. Microbiol., 53*(5), 1373-1383.

Schmidt, S. M., Houterman, P. M., Schreiver, I., Ma, L. S., Amyotte, S., Chellappan, B., et al. (2013). MITEs in the promoters of effector genes allow prediction of novel virulence genes in *Fusarium oxysporum*. *Bmc Genomics, 14*, doi 10.1186/1471-2164-14-119.

Schmidt, S. M., Lukasiewicz, J., Farrer, R., van Dam, P., Bertoldo, C., & Rep, M. (2016). Comparative genomics of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* reveals the secreted protein recognized by the *Fom-2* resistance gene in melon. *New Phytologist, 209*(1), 307-318, doi:10.1111/nph.13584.

Simons, G., Groenendijk, J., Wijbrandi, J., Reijans, M. G., J., Diergaarde, P., van der Lee, T., et al. (1998). Dissection of the *Fusarium I2* gene cluster in Tomato reveals six homologs and one active gene copy. *Plant Cell, 10*, 1055-1068.

Takken, F. L. W. & Tameling, W. I. L. (2009). To nibble at plant resistance proteins. *Science,* 324(5928), 744-746.

Tameling, W. I., Elzinga, S. D., Darmin, P. S., Vossen, J. H., Takken, F. L.W., Haring, M. A., et al. (2002). The tomato R gene products I-2 and MI-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity. *Plant Cell, 14*(11), 2929-2939.

Teunissen, H. A., Rep, M., Houterman, P. M., Cornelissen, B. J. C., & Haring, M. A. (2003). Construction of a mitotic linkage map of *Fusarium oxysporum* based on Foxy-AFLPs. *Mol. Genet. Genomics, 269*(2), 215-226.

van Dam, P., de Sain, M., Ter Horst, A., van der Gragt, M., & Rep, M. (2018). Use of comparative genomics-based markers for discrimination of host specificity in *Fusarium oxysporum*. *Appl Environ Microbiol, 84*(1), doi:10.1128/AEM.01868-17.

Van Dam, P., Fokkens, L., Schmidt, S. M., Linmans, J. H., Kistler, H. C., Ma, L. J., et al. (2016). Effector profiles distinguish *formae speciales* of *Fusarium oxysporum*. *Environ Microbiol, 18*(11), 4087-4102, doi:10.1111/1462-2920.13445.

Van Kan, J. A., van den Ackerveken, G. F. & de Wit, P. J. G. M. (1991). Cloning and characterization of cDNA of avirulence gene *avr9* of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. *Mol. Plant-Microbe Interact., 4*(1), 52-59.

Vlaardingerbroek, I., Beerens, B., Schmidt, S. M., Cornelissen, B. J. & Rep, M. (2016). Dispensable chromosomes in Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici. *Molecular Plant Pathology, 17*(9), 1455-1466, doi:10.1111/mpp.12440.

Widinugraheni, S., Nino-Sanchez, J., van der Does, H. C., van Dam, P., Garcia-Bastidas, F. A., Subandiyah, S., et al. (2018). A *SIX1* homolog in *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4 contributes to virulence towards Cavendish banana. *Plos One, 13*(10), e0205896, doi:10.1371/journal.pone.0205896.