

Avirulentiegenen in *Phytophthora infestans*, de veroorzaker van de aardappelziekte

Jun Guo^{1,2} en Francine Govers¹

¹Laboratorium voor Fytopathologie, Wageningen University; e-mail: francine.govers@wur.nl

²Institute for Vegetable and Flowers, CAAS, Beijing en College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, China

Op 20 oktober 2008 promoveerde Jun Guo aan Wageningen University op een proefschrift getiteld 'Phytophthora infestans avirulence genes; mapping, cloning and diversity in field isolates'. 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 University. Het onderzoek, werd uitgevoerd bij bovengenoemde leerstoelgroep en bij het Institute of Vegetable and Flowers van de Chinese Academy of Agricultural Sciences in Beijing, China, in het kader van een sandwich PhD-programma en werd financieel ondersteund door het interdisciplinaire onderzoeks- en onderwijsfonds van Wageningen University INREF en het Asian Facility Program. De volledige tekst van het proefschrift is als pdf file beschikbaar op de digitale bibliotheek van Wageningen University (<http://library.wur.nl/wda/dissertations/dis4514.pdf>).

Inleiding

De aardappelziekte, veroorzaakt door de oomyceet *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, is de meest verwoestende ziekte in aardappel wereldwijd en de grootste bedreiging voor de aardappelproductie in China. De kosten ten gevolge van verlies in opbrengst en kwaliteit, en voor chemische bestrijding lopen jaarlijks in de miljarden. Het gebruik van resistente aardappelplanten zou een efficiënte benadering kunnen zijn om de aardappelziekte onder controle te krijgen. Via veredeling zijn reeds verschillende resistentiegenen (*R*) uit wilde *Solanum*-soorten in de gecultiveerde aardappel ingekruist. De eiwitten waarvoor deze *R*-genen coderen herkennen specifieke fysio's van de ziektever-

wekker. Deze herkenning leidt tot een cascade van afweerreacties en resulteert uiteindelijk in geprogrammeerde celdood: een overgevoelheidsreactie waardoor de ziekteverwekker stopt met groeien en zich niet verder in de plant kan verspreiden. Helaas is deze, op *R*-gen gebaseerde resistentie, vaak van korte duur. *P. infestans* past zich snel aan de nieuwe situatie aan en is dan in staat om de herkenning te vermijden. Daardoor verliezen de meeste nieuwe cultivars hun resistentie binnen enkele jaren.

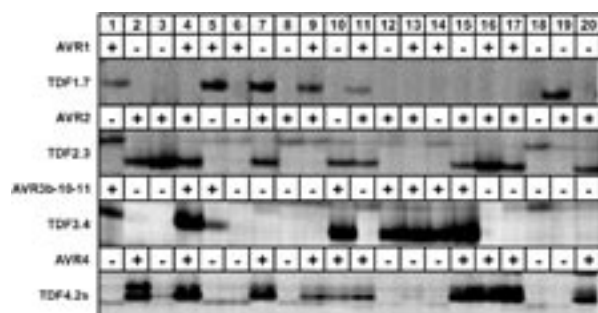
In de aardappel-*P. infestans*-interactie is de fysio-specifieke herkenning door *R*-genen gebaseerd op het 'gen-om-gen' -model. Volgens dit model wordt resistentie bepaald door de directe of indirecte interactie van een *R*-eiwit met zijn corresponderende effector, het product van een avirulentiegen (*Avr*). Als het *R*-gen of het *Avr*-gen ontbreekt of niet functioneel is, is de interactie compatibel en de aardappelplant gevoelig voor de ziekte. Om een beter inzicht te verwerven in de moleculaire basis van resistentie tegen de aardappelziekte is het van cruciaal belang om de interacties tussen *R*-eiwit en effector te ontrafelen. Een voorwaarde om deze interacties te kunnen bestuderen is de beschikbaarheid van meer gekloneerde *R*-genen en *Avr*-genen. Dit proefschrift beschrijft het karteren en kloneren van *Avr*-genen in *P. infestans*, en de fenotypische en genotypische diversiteit in *P. infestans*-veldisolaten in Noord China.

Het genereren van merkers geassocieerd met avirulentiegenen

Voor het isoleren van *P. infestans*-*Avr*-genen werd gebruikt gemaakt van een positionele

PROMOTIES

kloningstrategie. Allereerst werd een molecu-laair-genetische koppingskaart van *P. infestans* gegenereerd gebaseerd op 'Single Nucleotide Polymorphism' (SNP) -merkers en 'Amplified Fragment Length Polymorphism' (AFLP) -merkers. De karteringspopulatie bestond uit 83 F₁-nakomelingen afkomstig van twee Nederlandse veldisolaten, NL80029 en NL88133. Van 631 merkers (398 SNP en 233 AFLP merkers) die uitsplitsten in deze populatie, werden 534 merkers gepositioneerd op 19 koppingsgroepen met een totale lengte van 1144 centi-Morgan en een gemiddelde afstand van 2.14 centi-Morgan tussen twee flankerende merkers. Veertien van de koppingsgroepen zijn samengestelde koppingsgroepen die merkers van beide ouders bevatten. De andere zijn ouder-specifieke koppingsgroepen met merkers afkomstig van slechts één van de twee ouders.



Figuur 1. Identificatie van transcriptoom-merkers geassocieerd met Avr-genen. Voorbeelden van cDNA-AFLP-merkers die aanwezig zijn in avirulente (+) isolaten en afwezig in virulente (-) isolaten. TDF3.4 en TDF4.2s vertonen een segregatiepatroon dat overeenkomt met, respectievelijk, het AVR3b-AVR10-AVR11-fenotype en het AVR4-fenotype van de twee ouderlijnen van een kruisingspopulatie (laan 1: isolaat 80029; laan 2: isolaat 88133) en 18 van hun F₁ nakomelingen (laan 3-20). TDF4.2s is gebruikt voor de positionele klonering van *PiAvr4*. De segregatiepatronen van TDF1.7 en TDF2.3 komen niet overeen met die van het AVR1 of AVR2 fenotype en zijn daarom niet bruikbaar om deze Avr-genen te isoleren.

Gelijktijdig werd een zogenaamde 'transcriptional profiling' -strategie toegepast om transcripten te identificeren die geassocieerd zijn met avirulentie. cDNA-AFLP werd gebruikt om transcripten te vergelijken tussen *P. infestans*-isolaten met verschillende virulentiefenotypen. Een groot aantal avirulentie-geassocieerde TDF's ('Transcript Derived Fragments') werd gekloneerd en de DNA-volgorde werd bepaald. Vervolgens werden EST (Expressed Sequence Tags) en genoom-databanken doorgespiet om

meer sequentiegegevens te verkrijgen. Om veelbelovende kandidaten te identificeren werden selectiecriteria gebruikt die met behulp van bioinformatica getoetst werden, zoals het vóórkomen van een signaalpeptide, het aantal cysteine-residuen en mogelijke virulentiefuncties. Er werden vier TDFs gevonden die geassocieerd zijn met Avr-loci, twee voor *Avr4* en twee voor het *Avr3b-Avr10-Avr11*-locus (Figuur 1).

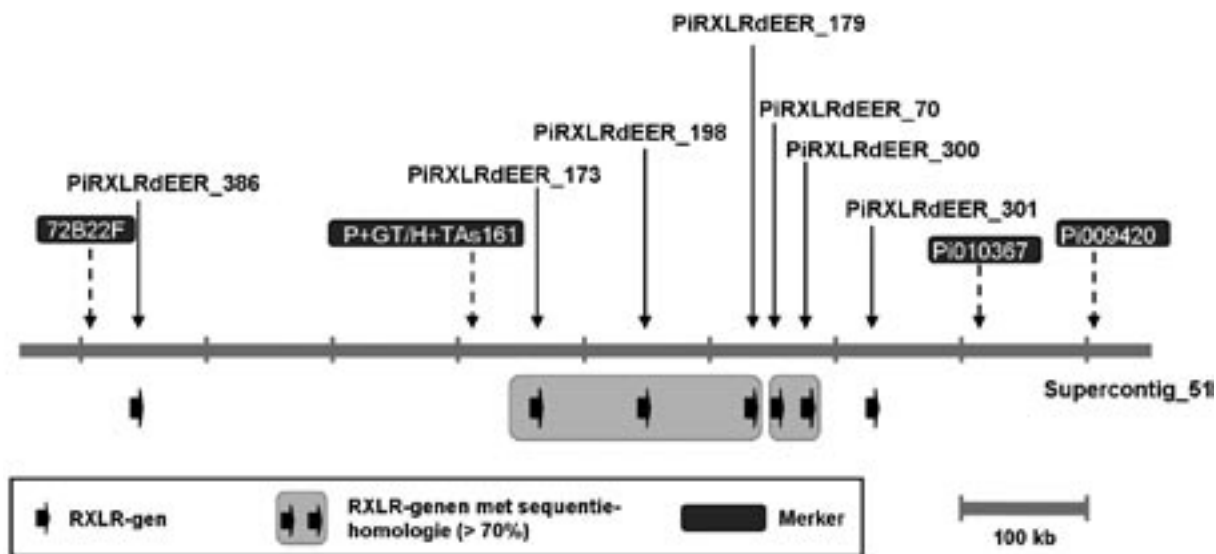
Identificatie van het *Phytophthora infestans* *Avr4*-gen

AFLP- en cDNA-AFLP-merkers, verkregen met genetische kartering en 'transcriptional profiling' en gekoppeld aan het *Avr4*-gen, werden gebruikt om met behulp van moleculair-biologische technieken het *P. infestans*-avirulentiegen *Avr4* te kloneren. *PiAvr4* codeert voor een eiwit van 287 aminozuren dat behoort tot de superfamilie van effectoren die allen een geconserveerd motief bevatten dat op basis van de aminozuursamenstelling RXLR-dEER genoemd wordt. Onderzoek elders, onder andere aan het *Phytophthora sojae* *Avr1b-1*-gen en het *P. infestans* *Avr3a*-gen, heeft aangetoond dat dit motief zorgt voor translocatie van de effector naar de gastheercel. Om de functie van *PiAvr4* te onderzoeken werden *P. infestans* fysio 4-isolaten (virulent op *R4*-planten) getransformeerd met *PiAvr4*. Dit resulteerde in transformanten die avirulent zijn op aardappellijnen die het *R4*-gen bevatten hetgeen aantoont dat *PiAvr4* verantwoordelijk is voor het opwekken van een resistentiereactie geïnitieerd door *R4*. Expressie van *PiAvr4* in *R4*-planten met behulp van PVX-agroinfectie en agroinfiltratie toonde aan dat *PiAvr4* inderdaad een effector is die een overgevoeligsreactie opwekt in *R4*-planten. Dit gebeurde niet in aardappelplanten die geen *R4*-gen bevatten zoals bijvoorbeeld Bintje. De aanwezigheid van een RXLR-dEER motief suggereert dat *PiAvr4* in de cel herkend wordt; echter, ook als *PiAvr4* naar de extracellulaire ruimte werd gedirigeerd trad overgevoeligheid op. Het verwijderen van het RXLR-dEER domein had geen effect op de activiteit van *PiAvr4* als elicitor van de overgevoeligsreactie. Fysio 4-isolaten hebben mutaties in *PiAvr4* die een verstoring geven in het open leesraam hetgeen resulteert in een vroegtijdig afgekapt eiwit dat niet functioneel is als een avirulentiefactor. Dit suggereert dat *PiAvr4* niet essentieel is voor virulentie.

Identificatie van kandidaatgenen voor *Avr1*

Onlangs is door het Broad Institute van Harvard en MIT in Cambridge, Massachusetts, USA, de DNA-volgorde bepaald van het genoom van *P. infestans*. Alle *Avr1*-geassocieerde merkers die afkomstig waren van genetische kartering, 'transcriptional profiling' en van DNA-volgordes van reeds eerder geselecteerde gekloneerde fragmenten werden *in silico* gelanceerd op het genoom van *P. infestans*. Dit leidde tot de afbake-

ning van een beperkt gebied van 800 kb waarop zeven genen liggen met eigenschappen die typisch zijn voor een oomyceten-*Avr*-gen (Figuur 2). Deze zeven genen coderen voor een uitgescheiden eiwit met een geconserveerd RXLR-dEER-motief in het amino-terminale deel en een variabel carboxy-terminaal deel. Elk van deze zeven RXLR-effectorgenen kan een kandidaat zijn voor *Avr1*. Ze werden nader gekarakteriseerd met bioinformatica-analyses gericht op Hidden Markov Model (HMM) -scores van het RXLR-mo-



Figuur 2. Identificatie van kandidaat-*Avr1*-genen. Bij het lanceren van een zestal *Avr1*-geassocieerde merkers op het *Phytophthora infestans*-genoom bleken er vier terecht te komen op supercontig 51. De vier merkers (in zwarte blokken) markeren een regio van 800 kilobasen waarop zeven RXLR-dEER-genen liggen. Het RXLR-dEER-motief is een karakteristiek onderdeel van een oomyceten-avirulentiefactor. De grijze blokken markeren drie, respectievelijk, twee RXLR-dEER genen die sequentiehomologie vertonen en mogelijk afstammen van hetzelfde oergen.

Tabel 1. De zeven RXLR-genen die in de 800 kb regio op supercontig 51 liggen.

Kandidaat- <i>Avr1</i> -gen	Coördinaten op supercontig 51	RXLR-dEER-motief en omgevende aminozuur-residuen	HMM-score van RXLR-dEER-motief ¹	Grootte van het eiwit (aminozuur)	Aantal W-Y-I-motieven ²
PiRxLRdEER_386	374802-375425	RGGGARQLRTATMSDDEARVSKLP	9	208	W(2) Y(1)
PiRxLRdEER_173	708835-710868	ASSSTRLLRKNSTVDLVGEERAPSIV	16	678	W(7) Y(6) L(6)
PiRxLRdEER_198	757631-758125	QNSSTKLLRYTDAVDIVDEERAPILE	15	165	W(1) Y(1) L(1)
PiRxLRdEER_179	853408-854931	ASSSTRLLRKNSTVDLVGEERAPSVV	16	508	W(5) Y(5) L(3)
PiRxLRdEER_70	889786-890511	YATTERLLRAHSSDKEEQKEEEERASIN	20	242	W(2) Y(1) L(1)
PiRxLRdEER_300	910183-910908	SVTTKRLRAHISGKEEGTEQEEQRGISIN	12	242	Y(1) L(1)
PiRxLRdEER_301	943349-943864	AIGNTRYLRAQPSNQEDEDRSFAVL	12	172	none

¹ De HMM van het RXLRdEER-motief is afgeleid van RXLRdEER regio's in 1307 RXLRdEER-eiwitten in *P. sojae*, *P. ramorum* en *P. infestans*

² De aantallen van elk geïdentificeerd motief in het C-terminaal domein is aangegeven tussen haakjes.

tief, en voorspellingen over de aanwezigheid van W, Y en L motieven in het carboxy-terminale deel (Tabel 1). Dit zijn motieven die vernoemd zijn naar de aminozuren tryptofaan (W), tyrosine (Y) en leucine (L) die op geconserveerde plaatsen in deze motieven voorkomen. Klonering en functionele analyses op basis van transiënte expressie-essays in planten die het resistentiegen *RI* hebben, kunnen aantonen of één van deze zeven kandidaten daadwerkelijk *Avr1* is.

Diversiteit in de *P. infestans*-populatie in Noord China

Om te onderzoeken in hoeverre genotypische diversiteit van *P. infestans*-isolaten gecorreleerd kan worden met fenotypische diversiteit, in het bijzonder de diversiteit van fysio-specifieke avirulentie, werden isolaten die tussen 1997 en 2003 verzameld zijn in Noord China, met name in Binnen-Mongolië, nader gekarakteriseerd. Alle isolaten hadden het A1-paringstype, het mitochondriale DNA-haplotype IIa en eenzelfde DNA-vingerafdruk op basis van 'Simple Sequence Repeat' (SSR) -merkers. Het SSR genotype, SG-01-01, verschilde van dat van de referentie-isolaten. In DNA-vingerafdrucken op basis van AFLP-merkers werd wel wat variatie gevonden: acht AFLP-genotypen verdeeld over twee clusters. In tegenstelling tot de redelijk uniforme DNA-vingerafdrucken waren de virulentie-spectra zeer divers en was er virulentie voor alle *R*-genen in de differentiële set (*RI* – *RI1*). Deze studie toont aan dat de *P. infestans*-populatie in Noord China waarschijnlijk tot een klonale lijn behoort die verschilt van de 'oude' US-1-lijn die tot 1980 wereldwijd domineerde. Het vóórkomen van vele verschillende fysio's in een populatie die overwegend uniform is wat betreft DNA-merkers wordt bediscussieerd in het kader van recent verworven inzichten in de moleculaire determinanten van avirulentie in *P. infestans* en hun rol in de 'gen-om-gen' -interactie met aardappel.

Tenslotte

In het laatste hoofdstuk van het proefschrift worden de gevolgen van de vindingen bediscussieerd met de nadruk op RXLR-dEER-effectoren, de klonering van *Avr*-genen, diversiteit van virulentie en duurzame resistentie tegen de aardappelziekte. Door verschillende kloneringstrategieën te combineren is het mogelijk de isolatie van potentiële *P. infestans*-*Avr*-genen te versnellen. Bovendien zullen screenings die gebruik ma-

ken van 'high throughput'-systemen de identificatie van de met de effectoren corresponderende *R*-genen mogelijk maken. De hoge diversiteit in virulentie die gevonden wordt in *P. infestans*-veldisolaten, zelfs binnen een klonale lijn, zou gecorreleerd kunnen zijn met het gegeven dat RXLR-effectorgenen de snelst evoluerende genen zijn in het genoom van *P. infestans*. Alles wijst erop dat het genereren van duurzame resistentie tegen de aardappelziekte een nog grotere uitdaging is dan eerder werd aangenomen.

Publicaties op basis van het proefschrift

- Guo, J, van der Lee, T, Qu, DY, Yao, YQ, Gong, XF, Liang, DL, Xie, KY, Wang, XW & Govers, F (2009) *Phytophthora infestans* isolates from Northern China show high virulence diversity but low genotypic diversity. *Plant Biology* 11: 57-67
- Guo J, Jiang RHY, Kamphuis LG & Govers F (2006) A cDNA-AFLP based strategy to identify transcripts associated with avirulence in *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetics and Biology* 43: 111-123
- Guo J, Weide R, Qu DY, Wang XW, Xie KY & Govers F (2005) Two AFLP markers linked to avirulence gene *Avr1* in *Phytophthora infestans*. *Scientia Agricultura Sinica*, 38(9): 1801-1804 (In het Chinees)
- Guo J, Qu DY, Wang XW, Jin LP, Xie KY, Jiang RHY & Govers F (2005) Identification of candidate expressed sequences associated with race-specific avirulence genes by cDNA-AFLP *Acta Horticulturae Sinica*, 32(1): 44-48 (In het Chinees)
- Guo J, Qu DY, Wang XW, Jin LP & Xie KY (2005) Advances in molecular genetics of potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* *Plant Protection*, 31(2): 9-13 (In het Chinees)
- 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

Stelling:

Als een onderzoeker complexe materie te lijf gaat, moet hij de volgende woorden van Albert Einstein in gedachten houden: "Alles moet zo eenvoudig mogelijk gemaakt worden, maar niet eenvoudiger".

PROMOTIES