

# Diversiteit en evolutie van resistentiegenen in knoldragende *Solanum*-soorten

Miqia Wang

Op 12 juni 2007 promoveerde Miqia Wang aan Wageningen Universiteit op het proefschrift getiteld 'Diversity and evolution of resistance genes in tuber-bearing *Solanum* species'. Promotor was Prof. Dr. M.S.M. Sosef, hoogleraar Biosystematiek, co-promotoren waren Dr. B. Vosman (Plant Research international) en Dr. R.G. van den Berg (leerstoelgroep Biosystematiek). Het onderzoek maakte deel uit van het PhD-Sandwichprogramma tussen Wageningen Universiteit en de Chinese Academy of Agricultural Sciences.



## Inleiding

Aardappel (*Solanum tuberosum* L.) is een gewas met een grote secundaire *gene pool* waarin vele belangrijke eigenschappen aanwezig zijn, die in veredelingsprogramma's gebruikt kunnen worden. De aardappelziekte, veroorzaakt door de oömyceet *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, is één van de ernstigste problemen in aardappelproductiegebieden. Het telen van aardappelen in Noordwest Europa is alleen mogelijk als het gewas veelvuldig behandeld wordt met bestrijdingsmiddelen. Rassen met ingebouwde resistentie tegen de aardappelziekte kunnen daarin verandering brengen, en mede daarom is er zoveel aandacht voor resistentieveredeling in dit gewas. Dit proefschrift beschrijft het gebruik van 'nucleotide binding site (NBS) profiling' om de systematiek van het geslacht *Solanum* te bestuderen en om merkers voor resistentiegenen te identificeren, die door veredelingsbedrijven kunnen

worden toegepast. Ook worden in detail de diversiteit en evolutie van twee al bekende *Phytophthora*-resistentiegenen (*Rpi-blb1* en *Rpi-blb2*) bestudeerd in een groot aantal *Solanum*-soorten.

## NBS profiling voor onderzoek naar plantensystematiek in knoldragende *Solanum*-soorten

NBS profiling is een moleculaire techniek waarmee gericht merkers kunnen worden gegenereerd in en rond resistentiegenen. Hiermee onderscheidt de techniek zich van de AFLP-techniek die willekeurig merkers genereert. Gebruikmakend van een set van meer dan honderd genenbank-accessies, die 47 knoldragende *Solanum*-soorten vertegenwoordigen, is de techniek geëvalueerd op geschiktheid voor fylogenie-reconstructie. De resultaten van NBS profiling zijn vergeleken met die verkregen via AFLP. Cladistische en fenetische analyses laten zien dat de twee

technieken verwantschapsbomen opleveren met vergelijkbare topologie en resolutie, hetgeen er op wijst dat NBS profiling een alternatief kan zijn voor AFLP in fylogenie-reconstructie. De NBS profiling-boom vertoonde geen duidelijk effect van selectie voor resistentiegenen. Het DNA van de merkers die comigreerden in verschillende knoldragende *Solanum*-soorten waren voor het overgrote deel meer dan 95% gelijk aan elkaar. Dit wijst erop dat homoplasie beperkt is met NBS profiling.

## Genetische diversiteit in Europese aardappelryassen en de identificatie van resistentiegen-specifieke merkers

De veranderingen in de genetische diversiteit van resistentiegen-loci in een set van 456 Europese aardappelryassen gedurende de afgelopen zeventig tot tachtig jaar is onderzocht met behulp van NBS profiling. De genetische diversiteit op

deze loci nam iets toe, vermoedelijk door veredelingsactiviteiten waarbij resistenties vanuit wilde soorten in de gecultiveerde aardappel zijn ingebracht. Verscheidene kandidaat-resistentiegenen werden geïdentificeerd door de *NBS profiling*-merkers te koppelen aan afstammings- en ziekte-resistentie-gegevens van de rassen. Omdat de homoplasie in *NBS profiling*-merkers laag was konden de merkers ook gekoppeld worden aan de knoldragende *Solanum*-soorten waaruit de resistenties vermoedelijk afkomstig waren. Eén van de geïdentificeerde merkers is zeer waarschijnlijk afkomstig uit *Solanum vernei*, gezien de aanwezigheid van de merker in zowel *S. vernei*-accessies als in rassen die *S. vernei* in hun stamboom hebben. De merker was ook gecorreleerd met nematoderesistentie-gegevens van de betrokken rassen.

### **Identificatie van geconserveerde homologen van *Rpi-blb1* in *Solanum stoloniferum***

Op basis van de Phytophthora-R-genen *Rpi-blb1* en *Rpi-blb2*, die oorspronkelijk geïdentificeerd zijn in *S. bulbocastanum*, is "allele mining" uitgevoerd in een groot aantal wilde knoldragende aardappelsoorten. Daarnaast is de structuur van het resistentiegen-cluster dat *Rpi-blb1* bevat geanalyseerd, door de aan- en afwezigheid van de genen die *Rpi-blb1* flankeren (*RGA1-blb* and *RGA3-blb*) vast te stellen. Het flankerende gen *RGA1-blb* was aanwezig en sterk geconserveerd, in alle geteste knoldragende *Solanum*-soorten en ook in de niet-knoldragende soorten *S. etuberosum*, *S.*

*fernandezianum* en *S. palustre*, hetgeen suggereert dat *RGA1-blb* reeds aanwezig was vóór de divergentie van knoldragende en niet-knoldragende *Solanum*-soorten. De frequentie van *RGA3-blb* was echter veel lager. Sterk geconserveerde *Rpi-blb1* (>99.5%) -homologen werden verassend genoeg niet alleen in *S. bulbocastanum* aangetroffen maar ook in *S. stoloniferum*, een tetraploïde soort uit de serie *Longipedicellata*. Een aantal dominante R-genen (*Rpi-sto1*, *Rpi-plt1*, *Rpi-pta1* and *Rpi-pta2*) werd geïdentificeerd in F1-populaties, welke gebaseerd waren op resistente genotypen die de *Rpi-blb1*-homoloog bevatten. *Rpi-sto1* en *Rpi-plt1* blijken op dezelfde positie op chromosoom VIII te liggen als *Rpi-blb1* in *S. bulbocastanum*. Gegevens over uitsplitsing geven ook aan dat er een additioneel Phytophthora-resistentiegen aanwezig is in drie van de vier uitsplitsende populaties. Anders dan *Rpi-blb1* werd *Rpi-blb2* niet aangetroffen in het onderzochte materiaal.

### **Diversiteit en evolution van de Phytophthora resistentiegenen *Rpi-blb1* en *Rpi-blb2* in *Solanum bulbocastanum* en *Solanum cardiophyllum***

De allel-frequentie en de allelische diversiteit van *Rpi-blb1* en *Rpi-blb2* werd onderzocht in accessies van *S. bulbocastanum* en de nauw verwante soort *S. cardiophyllum*. Sterk geconserveerde *Rpi-blb1*-allelen werden aangetroffen in 24 Mexicaanse accessies, maar niet in materiaal afkomstig uit Guatemala. Met sequentie analyse van een set genotypen werden negentien *Rpi-blb1*-haplotypen ontdekt. De resultaten beves-

tigen dat *Rpi-blb1* behoort tot de klasse van type II resistentiegenen, die langzaam evolueren. Alle vermoedelijk vatbare *Rpi-blb1*-sequenties zijn identiek, hetgeen suggereert dat dit allel door slechts een mutatie gebeurtenis is ontstaan. *Rpi-blb2* is aanwezig in slechts acht accessies van *S. bulbocastanum* en niet in de andere onderzochte wilde soorten. Samen met het feit dat alle onderzochte *Rpi-blb2*-allelen identiek zijn, suggereert dit dat *Rpi-blb2* recentelijk is geëvolueerd.

### **Toepassingen**

Het *Rpi-blb1*-gen werd oorspronkelijk ontdekt in, en gekloneerd uit, *S. bulbocastanum*, een soort die niet direct kruisbaar is met de cultuuraardappel. Dit onderzoek heeft aangetoond dat functionele homologen van *Rpi-blb1* ook aanwezig zijn in *S. stoloniferum*, een soort die wél direct kruisbaar is met de cultuuraardappel. Het *Rpi-sto1*-gen uit *S. stoloniferum* kan waarschijnlijk gemakkelijker in de cultuuraardappel geïntroduceerd worden dan het *Rpi-blb1*-gen uit *S. bulbocastanum*. Het is te verwachten dat ook voor andere resistentiegenen die aanwezig zijn in primitieve soorten kan gelden dat er functionele homologen aanwezig zijn in meer afgeleide en gemakkelijker met de cultuuraardappel kruisbare soorten. Het is daarom nuttig om voor de start van een veredelingsprogramma met een soort die niet direct kruisbaar is, eerst direct kruisbaar materiaal te evalueren op de aanwezigheid van datzelfde gen, zodat het veredelingsprogramma kan worden versneld, en tijd en geld kunnen worden bespaard.

PROMOTIES