

Transcriptoom- en mutantenanalyse van door rhizobacteriën geïnduceerde systemische resistentie in *Arabidopsis*

Bas W.M. Verhagen

Op 3 juni 2004 promoveerde Bas Verhagen aan de Universiteit Utrecht op het proefschrift getiteld '*Transcriptomics and knockout mutant analysis of rhizobacteria-mediated induced systemic resistance in Arabidopsis*'. Promotor was Prof. dr. ir. L.C. van Loon en co-promotor was dr.ir. C.M.J. Pieterse, leerstoelgroep Fytopathologie, Universiteit Utrecht. Dit onderzoek werd gefinancierd door de faculteit Biologie, Universiteit Utrecht.

Zoektocht naar ISR-gerelateerde genen in *Arabidopsis*

In dit onderzoek is gebruik gemaakt van de modelplant *Arabidopsis thaliana* (zandraket). Behandeling van de wortels van *Arabidopsis* met de bacterie *Pseudomonas fluorescens* stam WCS417r leidt tot ISR tegen een groot aantal bladpathogenen. In een poging om genen te vinden die geïnduceerd worden door WCS417r werd een collectie "gene trap" en "enhancer trap" lijnen gescreend. De gebruikte "gene trap" en "enhancer trap" lijnen bevatten een insertie van een extra stuk DNA, een *Ds* transposon, op een willekeurige plaats in het genoom. Het *Ds* transposon bevat het β -glucuronidase (*GUS*) gen met een minimale promotor. Wanneer het *Ds* transposon direct in, of in de buurt van, een actief gen is geïnserteed, wordt het *GUS* gen ook geactiveerd. Na toevoeging van een substraat wordt dit zichtbaar als blauwe kleur. Eén "enhancer trap" lijn liet specifiek *GUS* expressie zien in de vaatbundels van door WCS417r gekoloniseerde wortels. Bij toediening van de pre-

Inleiding

Planten worden voortdurend bedreigd door pathogene micro-organismen, zoals virussen, bacteriën en schimmels. Als een plant geïnfecteerd wordt door een virulent pathogeen worden in het aangetaste weefsel diverse afweermechanismen geactiveerd die erop gericht zijn de ziekteontwikkeling te vertragen. Dit verschijnsel wordt geïnduceerde resistentie genoemd. Als een plant in staat is door een lokale necrose het pathogeen in te perken, verwerft hij niet alleen lokaal, maar ook systemisch (in alle plantendelen) een verhoogde weerbaarheid. Deze vorm van resistentie wordt systemische verworven resistentie genoemd (afgekort SAR) en is effectief tegen verschillende typen pathogenen. Een resistentie die fenotypisch vergelijkbaar is met SAR kan worden geïnduceerd door bepaalde niet-pathogene, wortelkoloniserende *Pseudomonas* bacteriën. Deze vorm van geïnduceerde resistentie wordt aangeduid als geïnduceerde systemische resistentie (afgekort ISR). SAR en ISR

uiten zich beide in een verminderde kolonisatie van de plant door een infecterend pathogeen, met als gevolg dat zich minder ziektesymptomen ontwikkelen dan in een niet geïnduceerde plant. De ziekteverwekkers waartegen ISR en SAR effectief zijn, komen gedeeltelijk overeen. Toch zijn er grote verschillen tussen beide vormen van geïnduceerde resistentie. Inductie van SAR gaat gepaard met ophoping van het hormoon salicylzuur (SA) in de plantencel. Dit SA activeert een signaal-transductie cascade die leidt tot de activatie van een groep van genen die coderen voor zogenaamde "pathogenesis-related proteins" (PR-eiwitten). De signaal-transductie van ISR verloopt onafhankelijk van SA, maar vereist gevoeligheid voor de hormonen jasmonzuur (JA) en ethyleen (ET). Waar SAR gepaard gaat met een verhoogde expressie van een grote groep van PR genen, laat bij ISR geen van de bekende afweer-gerelateerde genen een verandering in expressie zien. De zoektocht naar genen die een belangrijke rol spelen in de inductie en expressie van ISR staat centraal

PROMOTIES

cursor van ET, 1-aminocyclopropan-1-carboxylzuur (ACC), aan de wortels werd eenzelfde expressiepatroon waargenomen. Het *AtTLP1* gen bleek verantwoordelijk voor dit door WCS417r en ACC geïnduceerde expressiepatroon. *AtTLP1* codeert voor een thaumatinachtig eiwit dat behoort tot de PR-5 familie van PR eiwitten. Sommige PR-5 eiwitten hebben een anti-microbiële werking. Daarom werd onderzocht of *AtTLP1* een rol speelt bij ISR. *AtTLP1* werd eveneens geactiveerd door *Pseudomonas putida* WCS358r en *P. fluorescens* WCS374r, maar niet door de niet ISR inducerende bacterie *Escherichia coli*. Voorts resulteerde overexpressie van *AtTLP1* in transgene planten niet in een verandering in het vermogen ISR tot expressie te brengen tegen het bladpathogeen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000). Bovendien had de uitschakeling van *AtTLP1* in een "knockout" mutant geen effect op ISR. Deze resultaten leiden tot de conclusie dat de verhoogde expressie van *AtTLP1* een algemene reactie van Arabidopsis is op de aanwezigheid van de *Pseudomonas* bacteriën en dat deze niet van groot belang is voor de inductie van resistentie tegen *Pst* DC3000.

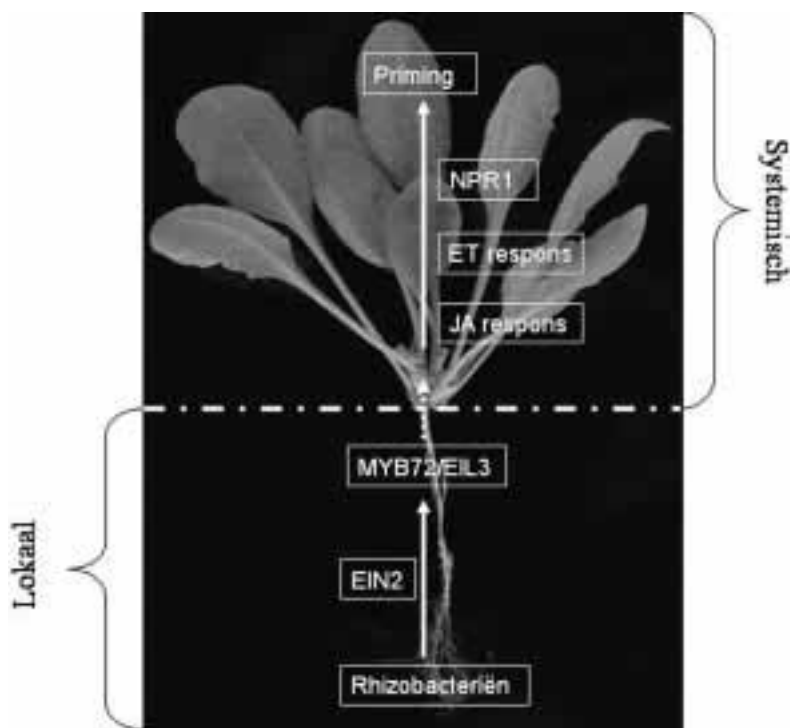
Microarray analyse van ISR-gerelateerde genexpressie

Om op een andere manier ISR-gerelateerde genen te identificeren, werd het transcriptoom van Arabidopsis onderzocht tijdens de inductie van ISR in de wortels en tijdens de expressie van ISR in de bladeren. Hierbij werd gebruik gemaakt van zgn. Affymetrix GeneChips met daarop probes voor de bepaling van de expressie van meer dan 8000 genen tegelijkertijd. Lokaal in de wortels resulteerde kolonisatie door WCS417r in

een significante verandering in de expressie van 97 genen. Een aantal van deze genen coderen voor transcriptiefactoren, andere voor eiwitten betrokken bij afweer of bij de ET signaal-transductie. In niet geïnoculeerde bladeren van door WCS417r gekoloniseerde planten werden echter geen significante veranderingen in genexpressie waargenomen. Deze resultaten betekenen dat de staat van ISR in systemisch weefsel niet gepaard gaat met waarneembare veranderingen in genexpressie, ondanks het feit dat deze bladeren aanzienlijk resistenter zijn tegen infectie door verschillende pathogenen. Om de reactie van de plant verder te analyseren werd de expressie van de 8000 genen onderzocht na "challenge" inoculatie van geïnduceerde planten met de ziekteverwekker *Pst* DC3000. In planten die gekoloniseerd waren met WCS417r bleken na *Pst* DC3000 infectie 81 genen een significant sterkere en/of snellere verandering in expressie te vertonen in vergelijking met de met *Pst* DC3000 geïnoculeerde controle planten.

Rhizobacteriën brengen Arabidopsis in verhoogde staat van paraatheid

Het in geïnduceerde planten sneller of in sterkere mate tot expressie komen van genen na infectie door een pathogeen in vergelijking met niet-geïnduceerde planten wordt "potentiëring" of "priming" genoemd. Een groot deel van deze gepotentiëerde genen bleek gereguleerd te worden door de plantenhormonen JA en ET. Deze potentiëring stelt de plant in staat effectiever te reageren op infectie door een pathogeen, hetgeen deels het brede spectrum van de effectiviteit van ISR kan verklaren. Het feit dat met name door JA en ET gereguleerde genen betrokken zijn bij "priming" in planten die ISR tot expressie brengen, zou kunnen verklaren waarom ISR hoofdzakelijk werkzaam is tegen ziekteverwekkers die gevoelig zijn voor door JA en/of ET gereguleerde afweermechanismen in Arabidopsis.



Figuur 1. Schematische weergave van de ISR signaaltransductie route in Arabidopsis

PROMOTIE

Rol van MYB transcriptiefactor in ISR signaal-transductie

Om de mogelijke betrokkenheid bij ISR te onderzoeken van de genen die door WCS417r specifiek in de wortels worden aangeschakeld werden zgn. "knockout" mutanten getoetst. Het grootste deel van de "knockout" mutanten bleek niet gestoord te zijn in het vermogen ISR tot expressie te brengen na kolonisatie van de wortels door WCS417r en dus niet van essentieel belang te zijn voor de inductie van ISR. Echter, een "knockout" mutant in het door WCS417r geïnduceerde gen *AtMYB72* bleek niet meer in staat tot expressie van ISR tegen *Pst* DC3000. *AtMYB72* codeert voor een R2R3 MYB-type transcriptiefactor. Naast het verlies van ISR inductie door WCS417r, bleek de *myb72* mutant ook niet meer in staat om ISR tot expressie te brengen na toedie-

ning van een celwandpreparaat van WCS417r of na kolonisatie van de wortels door *P. putida* WCS358r. Blijkbaar is *AtMYB72* een essentiële factor voor de inductie van ISR in de wortels. Evenals ISR-inducerende rhizobacteriën bleek de ET precursor ACC de expressie van *AtMYB72* aan te schakelen in de wortels, terwijl JA geen effect had. Omgekeerd bleek de door WCS417r geïnduceerde expressie van *AtMYB72* geblokkeerd te zijn in de ET ongevoelige mutant *ein2-1*. Deze resultaten duiden erop dat de waargenomen expressie van *AtMYB72* na kolonisatie van de wortels door WCS417r wordt gereguleerd door ET.

Conclusie

Op grond van de in dit proefschrift beschreven resultaten werd het volgende model opgesteld voor de signaal-transductieroute van ISR (Figuur 1). Kolonisatie van de wortels door WCS417r leidt lokaal tot

significante veranderingen in de expressie van een groot aantal genen. Sommige van deze genen, zoals *AtMYB72*, zijn essentieel voor de inductie van ISR, terwijl andere, zoals *AtTLP1*, waarschijnlijk bij andere processen betrokken zijn. ET signaal-transductie speelt een belangrijke rol bij de inductie van *AtMYB72* door WCS417r. Omdat *AtMYB72* alleen lokaal in de wortels wordt aangeschakeld en niet systemisch in het blad, is *AtMYB72* mogelijk betrokken bij productie of transport van een signaal dat systemisch door de plant wordt verspreid. Perceptie van dit signaal in het blad leidt niet direct tot waarneembare veranderingen in genexpressie. Echter, na infectie door *Pst* DC3000 laten ISR planten gepotentieerde veranderingen zien in het expressiepatroon van een groot aantal genen. Het grootste deel van deze genen wordt gereguleerd door ET en/of JA. Dit kan verklaren waarom ISR vooral effectief is tegen pathogenen die gevoelig zijn voor door ET/JA geregleerde afweerreacties.

PROMOTIE