

Moleculaire evolutie van *Cladosporium fulvum* resistentiegenen in wilde tomaat

M. Kruijt

Op 27 september 2004 promoveerde Marco Kruijt aan Wageningen Universiteit op het proefschrift getiteld 'Molecular evolution of *Cladosporium fulvum* disease resistance genes in wild tomato'. Promotor was Prof. dr. ir. P.J.G.M. de Wit en co-promotor was dr. ir. B.F. Brandwagt, Leerstoelgroep Fytopathologie, Wageningen Universiteit. Het onderzoek werd gefinancierd door de Technologiestichting STW.

Inleiding

De wereldbevolking zal de komende jaren sterk toenemen, waardoor het van cruciaal belang is om de agrarische productie te verhogen. Inspanningen om belangrijke voedselgewassen tegen hun pathogenen te beschermen kunnen profiteren van kennis van resistentiegenen (*R* genen) in natuurlijke populaties planten. In het proefschrift worden de verschillende soorten resistentie van planten tegen pathogenen besproken. Verschillende klassen *R* genen zijn geïdentificeerd die functioneren in overeenstemming met de gen-omgen relatie, waarin voor elk *R* gen in de plant een complementair avirulentie (*Avr*) gen aanwezig is in het pathogeen. In twee modellen wordt de evolutionaire dynamiek van *R* genen in natuurlijke plantpopulaties beschreven. Het 'birth-and-death' model veronderstelt dat nieuwe *R* genen continue worden aangemaakt ('birth'), welke snel doorbroken worden door virulente stammen van het pathogeen, en als gevolg daarvan uit de populatie zullen verdwijnen ('death'). In het 'trench-warfare' model worden *R* genen gedurende een lange periode in de plant gehand-

haafd en fluctueert de frequentie van individuele *R* genen in de tijd.

Cladosporium fulvum resistentie in tomaat

Het *Cladosporium fulvum*-tomaat pathosysteem volgt de gen-omgen relatie en is een modelsysteem om de interactie tussen biotrofe pathogene schimmels en planten te bestuderen. *C. fulvum* scheidt tijdens infectie van een tomatenplant *Avr* eiwitten uit, welke specifiek herkend worden in tomatenplanten die de complementaire *C. fulvum* resistentie genen (*Cf* genen) bevatten. Deze herkenning leidt tot een overgevoeligheidsreactie waardoor geen verdere schimmelgroei mogelijk is (Figuur 1). *Cf* genen coderen voor membraan-gebonden receptorachtige eiwitten, wat overeenkomt met de voorspelde extracellulaire herkenning van de *Avr* eiwitten. De *Avr4-Cf-4* en *Avr9-Cf-9* genparen zijn uitvoerig bestudeerd. De *Cf-4* en *Cf-9* genen behoren tot de *Hcr9* (Homologen van het *C. fulvum* resistentie gen *Cf-9*) genfamilie, waar zowel *Cf* genen als *Hcr9s* met onbekende functie toe behoren.

De meeste *Hcr9s* zijn gelokaliseerd in clusters van opeenvolgende genen (Figuur 2) wat kan leiden tot uitwisseling van sequenties tussen *Hcr9s*. Middels deze sequentie uitwisseling kunnen nieuwe *Hcr9s* en daarmee mogelijk nieuwe *Cf* genen ontstaan.

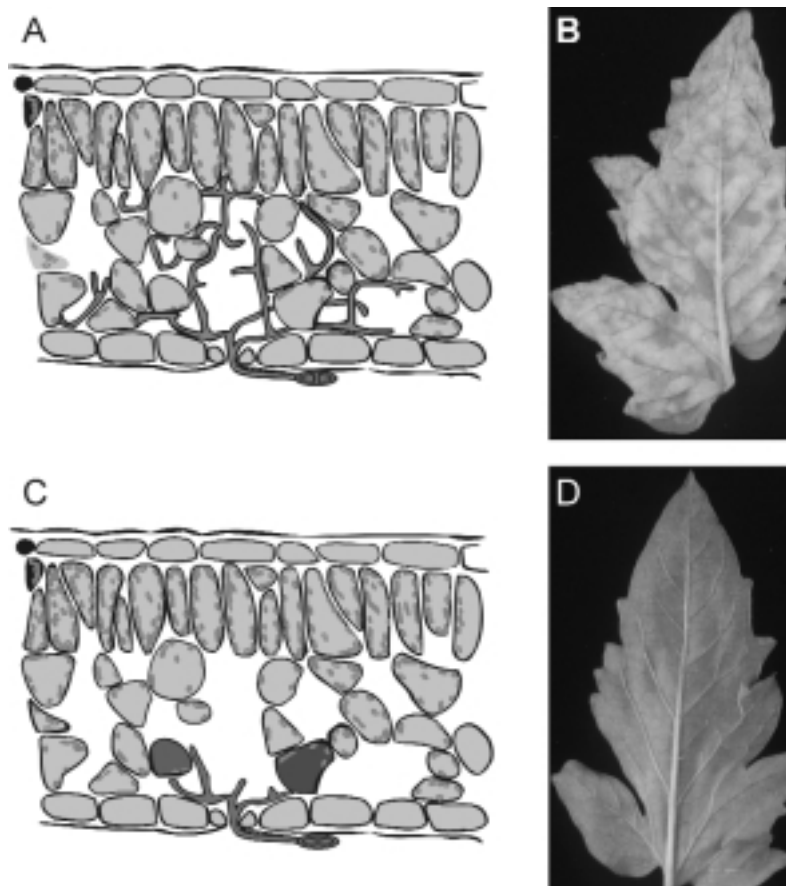
Twee verschillende genen geven dezelfde resistentie

De evolutie van de *Hcr9* genfamilie is gekarakteriseerd door analyse van *Hcr9* clusters uit enkele tomaten genotypes. De variatie in *Hcr9s* die betrokken zijn bij de herkenning van dezelfde elicitor is echter nog niet beschreven en vormt het belangrijkste onderwerp van dit proefschrift. De variatie in het *Cf-9* gen in de wilde tomatensoort *Lycopersicon pimpinellifolium* (de Peruaanse bestomaat), waaruit *Cf-9* afkomstig is, is eerst bestudeerd. In deze studie is het *9DC* gen geïdentificeerd, dat dezelfde functie in *Avr9* herkenning heeft als *Cf-9*. *Avr9* herkenning werd verspreid over de hele *L. pimpinellifolium* populatie gevonden en waarschijnlijk zijn alleen de *9DC* en *Cf-9* genen hier verantwoordelijk voor. Het *Cf-9* cluster bestaat uit vijf genen (*Hcr9-9A* t/m *Hcr9-9E*) waarvan *Hcr9-9C* het *Cf-9* gen is (Figuur 2). De eerste helft van *9DC* is bijna identiek aan *Hcr9-9D*, een gen naast *Cf-9*, en de tweede helft is bijna identiek aan

Cf-9. De frequentie van *9DC* in de *L. pimpinellifolium* populatie is hoger dan die van *Cf-9* en *9DC* wordt gevonden in een groter geografisch gebied. Dit suggereerde dat *Cf-9* geëvolueerd is uit *9DC* door intragene recombinatie tussen *9DC* en een andere *Hcr9*. Het *9DC* eiwit heeft dezelfde activiteit en specificiteit als *Cf-9*, hoewel beide eiwitten 61 aminozuren verschillen. Dit toont aan dat natuurlijke *Hcr9* eiwitten met dezelfde functie aanzienlijk kunnen verschillen in aminozuursamenstelling.

Isolatie en analyse van een resistentiegen cluster

De evolutionaire relatie tussen *Cf-9* en *9DC* is verder bestudeerd door het *9DC* cluster te isoleren uit *L. pimpinellifolium* LA1301, waaruit *9DC* afkomstig is. Met behulp van moleculaire technieken is het gehele *9DC* cluster geïsoleerd en gesequenced. Het *9DC* cluster bevat drie *9DC* genen (*9DC1*, *9DC2* en *9DC3*), orthologen van de *Hcr9-9A* en *Hcr9-9E* genen van het *Cf-9* cluster, en drie fragmenten van *Hcr9s*. Door vergelijking van de *Cf-9* en *9DC* clusters zijn meerdere veranderingen in het centrale gedeelte van het cluster geïdentificeerd, maar geen aan de uiteinden van het cluster. Bovendien zijn sterke aanwijzingen gevonden dat *9DC* het product is van recombinatie tussen *Cf-9* en *Hcr9-9D*, in tegenstelling tot wat eerder gesuggereerd werd. De drie *9DC* genen zijn het resultaat van meerdere inter- en intragene recombinaties. Alledrie de *9DC* genen zijn actief in Avr9 herkenning wanneer ze tot overexpressie worden gebracht in een agroinfiltratie experiment, maar met hun eigen promotor is alleen *9DC2* actief. Waarschijnlijk is *9DC2* dus het belangrijkste *9DC* gen dat betrokken is bij de Avr9 herkenning in *L. pimpinellifolium* LA1301.



Figuur 1. De compatibele en incompatibele interactie tussen tomaat en *Cladosporium fulvum*.

- A. Schematische weergave van een dwarsdoorsnede van een gevoelig tomatenblad na inoculatie met een virulent *C. fulvum* isolaat. Een schimmeldraad is door een open bladmondje het blad binnengedrongen, waarna *C. fulvum* de extracellulaire ruimte koloniseert.
- B. Onderkant van een gevoelig tomatenblad, twee weken na inoculatie met een virulent *C. fulvum* isolaat (compatibele interactie). De schimmel sporuleert uitbundig.
- C. Schematische weergave van een dwarsdoorsnede van een resistent tomatenblad na inoculatie met een avirulent *C. fulvum* isolaat. Nadat *C. fulvum* door een open huidmondje het blad is binnengedrongen wordt de schimmel herkend, wat leidt tot een overgevoelighedsreactie (weergegeven als donkere cellen), waardoor de schimmelgroei wordt gestopt.
- D. Onderkant van een resistent tomatenblad, twee weken na inoculatie met een avirulent *C. fulvum* isolaat (incompatibele interactie). Er zijn geen zichtbare symptomen van een infectie.

Cladosporium fulvum: een oud pathoog van wilde tomaat

De geringe variatie in *Cf-9* en *9DC* in de *L. pimpinellifolium* populatie doet vermoeden dat *Cf* genen als gevolg van een selectiedruk

sterk geconserveerd zijn. Door de complexe structuur van de *Hcr9* genfamilie zouden echter ook door convergente evolutie *Cf* genen met dezelfde specificiteit kunnen ontstaan. Om te bestuderen hoe *Hcr9s* die dezelfde *C. fulvum* elicitor herkennen evolueren, is de variatie in functionele homologen van *Cf-4* en *Cf-9* in wilde tomatensoorten onderzocht. In het gehele



Figuur 2. Schematische weergave van de Cf-4 en Cf-9 resistentiegenclusters.

De pijlen geven Hcr9 genen weer (4A-4E en 9A-9E). Zwart getinte genen geven resistentie tegen *Cladosporium fulvum*, grijs getinte genen geven partiële resistentie tegen *C. fulvum*, en wit getinte genen geven geen resistentie tegen *C. fulvum*.

A. Het Cf-4 resistentiegen cluster van de wilde tomatensoort *Lycopersicon hirsutum*, waarin de *C. fulvum* resistentiegenen Cf-4 (4D) en Cf-4E (4E) liggen.

B. Het Cf-9 resistentiegen cluster van de wilde tomatensoort *L. pimpinellifolium*, waarin het *C. fulvum* resistentiegen Cf-9 (9C) en het partiële resistentiegen Hcr9-9B (9B) liggen.

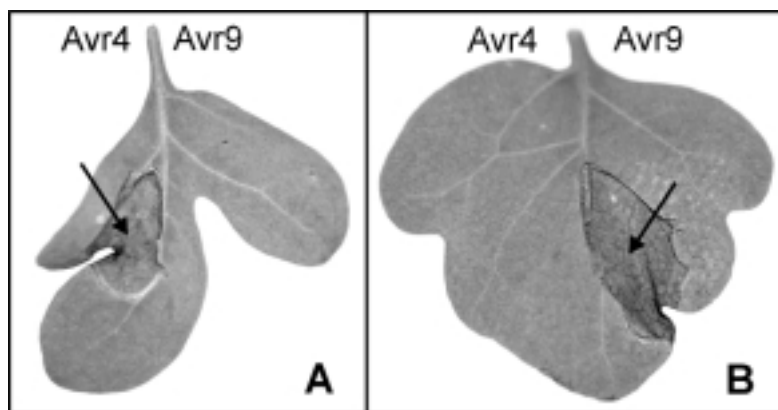
tomaten genus zijn planten geïdentificeerd die reageren met een overgevoelighedsreactie op Avr4 of Avr9 (Figuur 3). Van deze planten zijn middels PCR Hcr9s geamplificeerd, waarvan vervolgens met een test in tabak bekeken is of deze betrokken zijn bij Avr4 of Avr9 herkenning. De isolatie van een aantal sterk geconserveerde functionele homologen van Cf-4 en Cf-9 uit uiteenlopende tomatensoorten suggereert sterk dat deze genen oud zijn en al bestonden voor de soortsvorming in wilde tomaat. Deze resultaten suggereren bovendien dat *C. fulvum* al een pathogeen van de 'oertomaat' was die tijdens de evolutie van de wilde tomaat selectiedruk heeft uitgeoefend, waardoor

de functionele homologen van Cf-4 en Cf-9 in de huidige wilde tomatensoorten bewaard zijn gebleven.

Automatische overgevoelighedsreactie

Tijdens de studie naar functionele Cf-4 en Cf-9 homologen zijn ook twee Hcr9s uit *L. peruvianum* geïsoleerd die een elicitor-onafhankelijke overgevoelighedsreactie (hypersensitive response of HR) induceren in verschillende tabaksoorten wanneer ze middels agroinfiltratie in tabak tot

expressie worden gebracht. Deze Hcr9s zijn auto-activatoren van HR genoemd, omdat ze 'automatisch' tot een overgevoelighedsreactie leiden. Daarnaast zijn tevens door *in vitro* Hcr9 sequenties uit te wisselen auto-activatoren gegenereerd. De auto-activatoren vertonen verschillende activiteiten in vijf geselecteerde tabaksoorten en gebruiken dezelfde signaal transductie cascade als Cf-9. Een aantal modellen die de elicitor-onafhankelijkheid van de auto-activatoren verklaren en de bruikbaarheid van de auto-activatoren in het bestuderen van de mechanismen van de resistentie door Cf genen worden besproken.



Figuur 3. Voorbeelden van een specifieke overgevoelighedsreactie van wilde tomatenblaadjes na injectie met de *Cladosporium fulvum* eiwitten Avr4 en Avr9. Beide blaadjes zijn links met Avr4 en rechts met Avr9 geïnjecteerd. Een specifieke overgevoelighedsreactie leidt tot necrose (celdood, aangegeven met pijl).

A. *Lycopersicon parviflorum* blaadje met specifieke overgevoelighedsreactie op Avr4.

B. *Lycopersicon hirsutum* blaadje met specifieke overgevoelighedsreactie op Avr9.

Conclusies en vooruitblik

De evolutie van het Cf-9 gen in de wilde tomatensoort *L. pimpinellifolium* is in detail bestudeerd. Hieruit is gebleken dat binnen deze soort naast Cf-9 nog een tweede gen, het 9DC gen, dezelfde resistentie tegen *C. fulvum* geeft. Bestudering van de clusters waarin beide genen liggen liet zien dat Cf-9 ouder is dan 9DC. Verder is gebleken dat in verschillende wilde tomatensoorten het 'oude' Cf-9 gen voorkomt. Hetzelfde geldt voor het Cf-4 gen. Dit betekent dat *C. fulvum* waarschijnlijk al een pathogeen van de 'oertomaat' was. Uit wilde tomaten zijn daarnaast een tweetal Cf homologen geïso-

leerd die een 'automatische' overgevoeligheidsreactie in tabak geven. Het isoleren van meerdere functionele *Cf-4* en *Cf-9* homologen per wilde tomatensoort kan het inzicht in de evolutie van deze resistentiegenen verder vergroten. Daarbij zijn ook niet-functionele homologen van *Cf-4* en *Cf-9* inte-

ressant, omdat deze weliswaar geen resistentie geven, maar wel informatie kan geven over de evolutionaire mechanismen die betrokken zijn bij het ontstaan en in stand houden van functionele resistentiegenen. In dit opzicht zou ook het verzamelen van natuurlijke *C. fulvum* isolaten van wilde to-

maten interessant zijn. Door te kijken naar de avirulentiegenen van deze isolaten en deze te vergelijken met de *Cf* resistentiegenen die in de wilde tomaten aanwezig zijn, kan bepaald worden of *C. fulvum* en wilde tomaat inderdaad een wederzijdse selectie op elkaar uitoefenen.

Lidmaatschap van de KNPV

Het lidmaatschap biedt u:

- Vrije deelname aan de gewasbeschermingsdagen
- Gratis abonnement op 'Gewasbescherming'
- Deelname aan de algemene ledenvergaderingen met stemrecht; statuten worden op verzoek toegezonden
- Mogelijkheid van een collectief abonnement (tegen gereduceerd tarief) op het European Journal of Plant Protection

Het lidmaatschap loopt van 1 januari tot en met 31 december. Bij tussentijdse toetreding is een evenredig gedeelte van de contributie verschuldigd.

Opzeggen van het lidmaatschap dient voor 1 december schriftelijk te geschieden.

Aanmeldingen:

Mevr. M. Roseboom

Adm. Koninklijke Nederlandse Plantenziektkundige Vereniging,


Postbus 31,

6700 AA Wageningen

E-mail: m.roseboom2@chello.nl

Het secretariaat van de KNPV is telefonisch bereikbaar op 0317-483654

Als nieuw lid ontvangt u als welkomstgeschenk de 'Lijst van Gewasbeschermingskundige Termen' (verkoop-prijs € 12,50). Na acceptatie door het bestuur volgt een acceptgiro

 of copie

Ondergetekende meldt zich aan als:

| | Nederland/België | Overige landen |
|---|------------------|----------------|
| <input type="checkbox"/> Gewoon lid van de KNPV | € 25,- | € 35,- |
| <input type="checkbox"/> Gewoon lid van de KNPV inclusief een abonnement op het EJPP | € 146,- | € 156,- |
| <input type="checkbox"/> Lid-donateur van de KNPV | € 65,- | |

Naam : _____

Straat : _____

Postcode : _____ Plaats : _____

Land : _____

Datum : _____ Handtekening : _____

PROMOTIES