

Moleculaire evolutie van het ziekteresistentiegen *Rx* in *Solanum*

Patrick Butterbach

Op 21 september 2007 promoveerde Patrick Butterbach aan Wageningen Universiteit op het proefschrift getiteld 'Molecular evolution of the disease resistance gene *Rx* in *Solanum*'. Promotor was Prof. Dr. Ir. Jaap Bakker van de leerstoelgroep Nematologie. Co-promotoren waren Dr. Ir. Aska Goverse en Dr. Ir. Erin Bakker, beiden verbonden aan de leerstoelgroep Nematologie van Wageningen Universiteit. Het onderzoek werd uitgevoerd bij de afdeling Nematologie in Wageningen en is gefinancierd door de Robert Bosch Stiftung, het Centre for Biosystems en Genomics (CBSG) en de EU-projecten APOPHYS en BioExploit.

Inleiding

Aardappel (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) is het vierde voedselgewas ter wereld met een jaarlijkse opbrengst van ongeveer vierhonderd miljoen ton. De geschiedenis van de domesticatie van de aardappel toont aan dat ziekteverwekkers het spoor van de aardappel volgen, wat tot omvangrijke productieverliezen leidt. Planten, en dus ook de aardappel, hebben verdedigingsmechanismen ontwikkeld die samen met de potentiële ziekteverwekkers zijn geëvolueerd. Zeer effectief is een systeem dat gebruik maakt van resistentiegenen (*R*-genen). De eiwitten waarvoor de *R*-genen coderen zijn in staat om specifieke eiwitten afkomstig van een pathogeen te herkennen. Deze laatste eiwitten worden aangeduid als avirulentieproducten en de genen die ervoor coderen als avirulentiegenen (*Avr*-genen). Het mechanisme waarin één *R*-genproduct (direct of indirect) specifiek een interactie aangaat met één *Avr*-genproduct wordt ook wel gen-om-gen-interactie genoemd. Tijdens de zoektocht naar duurzame resistentie in voedselgewassen is een nog steeds toenemend aantal *R*-genen geïdentificeerd en gekarakteriseerd. Dit heeft belangrijke informatie over de genomische organisatie en de evolutionaire dynamiek opge-

leverd. *R*-genen zijn bijvoorbeeld vaak georganiseerd in complexe clusters in het genoom; zogenaamde 'hotspots' voor resistentie.

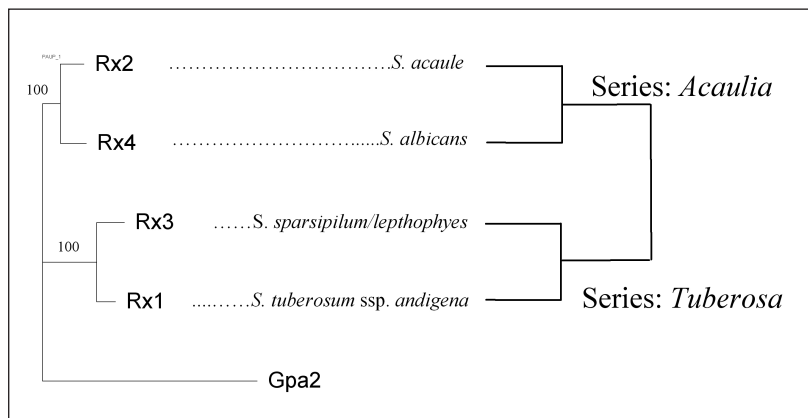
Hypotheses

De evolutie van de gastheer-pathogeeninteractie die gebaseerd is op de gen-om-gen-interactie wordt beschreven volgens de twee volgende hypothesen. De eerste hypothese is de wapenwedloophypothese ('*arms race hypothesis*'), die veronderstelt dat nieuwe *R*-gen-allelen ontstaan in een plantenpopulatie en dat resistentie-allelen die door het pathogeen doorbroken zijn vervangen worden. Deze hypothese postuleert een korte levensverwachting voor een specifiek *R*-gen-allel. Meer recentelijk is de loopgravenoorloghypothese ('*trench warfare hypothesis*') voorgesteld. In deze hypothese wordt verondersteld dat de dynamiek van *R*-genen en *Avr*-genen te verklaren is door een herhaalde opkomst en teruggang van resistentie- en avirulentie-allelen. De frequentie van deze dynamiek is afhankelijk van de selectiedruk en resulteert in het behoud van resistentie-allelen als gebalanceerde polymorfismen in een natuurlijke populatie gedurende langere tijd (lange levensverwachting).

Resistentiecluster

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is het bestuderen van de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan de evolutie van de specificiteit van *R*-genherkenning. Hierbij wordt gebruik gemaakt van het virusresistentiegen *Rx1* in aardappel. *Rx1* en het nauwverwante nematoderesistentiegen *Gpa2* bevinden zich beide in één *R*-gencluster en behoren tot de klasse van de *coiled coil-nucleotide binding site-leucine rich repeat* (CC-NBS-LRR)-resistentiegenen, zo genoemd op basis van gemeenschappelijke eiwitstructuren. In dit

PROMOTIES



Figuur 1. Een UPGMA-dendrogram (links) van een nucleotidensequentie-alignement met de gevonden functionele Rx-orthologen en Gpa2 wordt vergeleken met de fylogenetische verwantschap tussen de bijbehorende Solanum-soorten (rechts). Het taxonomisch schema van de soorten is een compositie van morfologische en moleculair-genetische data gebaseerd op AFLP.

cluster zijn nóg twee resistentiegenhomologen geïdentificeerd, waarvan er één incompleet is en één een volledig functioneel gen met onbekende specificiteit lijkt te zijn. De lengte van dit R-gencluster is ongeveer 110 kb en het ligt op een introgressiesegment afkomstig uit *S. tuberosum* ssp. *andigena* op chromosoom 12 van de diploïde aardappelkloon SH. De overeenkomst tussen de eiwitsequenties van *Rx1* en *Gpa2* is ongeveer 87%. Ondanks deze grote overeenkomst induceren de twee genen resistentie tegen twee taxonomisch volslagen ongerelateerde ziekteverwekkers. Daarnaast lijkt de werking van deze twee genen ook totaal verschillend te zijn. *Rx1* leidt tot een extreem snelle en vrijwel onzichtbare resistentiereactie tegen het aardappelvirus X (PVX), terwijl *Gpa2* een veel langzamer en mildere resistentie tegen het aardappelcystenaaltje *Globodera pallida* vertoont. In de aardappelsoort *S. acaule* is een gen geïdentificeerd dat zeer homogoloog, maar niet identiek, is aan *Rx1*. Dit gen, *Rx2*, heeft exact dezelfde specificiteit en werking als *Rx1* en is dus een functionele ortholoog.

In dit onderzoek is begonnen met de analyse van het *Rx1/Gpa2*-resistentiecluster van drie *S. tuberosum* spp. *tuberosum*-haplotypen afkomstig van de diploïde aardappels SH en RH. Dit resulteerde in de identificatie van nog eens negen homologen van *Rx1* en *Gpa2* in deze regio.

Rx1-orthologen

Vervolgens is een studie gedaan naar het voorkomen van functionele *Rx1*-orthologen in wilde aardappelsoorten. De ontdekking van functionele orthologen in minder verwante *Solanum*-soorten zal een lange levensduur van *Rx* en daarmee het loopgravenoorlogmodel ondersteunen. In eerste instantie zijn 35 soorten, die allemaal tot het geslacht *Solanum* behoren getest. Dit resulteerde in de ontdekking van twee

nieuwe functionele orthologen van het resistentiegen *Rx1*. Deze twee functionele orthologen zijn ontdekt in een natuurlijke hybride van de wilde aardappelsoorten *S. leptophyes* en *S. sparsipilum* en in de soort *S. albicans*. Ze hebben de namen *Rx3* en *Rx4* gekregen. Een functionele analyse van *Rx3* en *Rx4* toont aan dat deze twee orthologen inderdaad resistentie tegen PVX induceren in respectievelijk *S. leptophyes* x *S. sparsipilum* en *S. albicans*. De identificatie van *Rx3* en *Rx4* samen met *Rx1* en *Rx2* is het eerste voorbeeld van functionele orthologen uit de klasse van NBS-LRR-resistentiegenen in vier verschillende plantensoorten. Hieropvolgend zijn ongeveer vijfduizend genotypen, afgeleid van duizend accessies die tweehonderd *Solanum*-soorten vertegenwoordigen geanalyseerd. Dit resulteerde in de ontdekking van veertien additionele *Rx*-kandidaatgenen vanuit ver verwante *Solanum*-soorten. Onder deze kandidaatgenen bevindt zich een gen (*Rxedn*) dat wel de *Rx*-specificiteit bezit, maar niet functioneel is vanwege een deletie in de eerste helft van het gen. Uit deze resultaten kan afgeleid worden dat PVX-herkenning door *Rx*-orthologen relatief oud is en dat de *Rx*-orthologen waarschijnlijk afgeleid zijn van één voorouderlijk gen. Dit gen is waarschijnlijk ontstaan voordat de groepen *Tuberosa* (Peru) en *Acaule/Demissum* gedivergeerd zijn.

Genevolutie en organisatie

Om meer inzicht te krijgen in de structurele en evolutionaire relaties van dit resistentiegencluster, zijn de sequenties van 75 *Rx1/Gpa2*-homologen van tien verschillende *Solanum*-soorten verder geanalyseerd. Deze analyse behelsde ook de vier functionele orthologe virusresistentiegenen *Rx1-4*, het incomplete gen *Rxedn* en het nematoderesistentiegen *Gpa2*. Ongeveer een derde van de homologen codeert voor een eiwit met een compleet CC-, NBS- en LRR- domein,

analoog aan *Rx* en *Gpa2*. Dit suggereert de aanwezigheid van functionele *R*-genen met onbekende specificiteit. Een structureel variabele sequentie is geïdentificeerd in een bepaald stuk van het LRR-domein (LRR10). Op basis van deze variabele sequentie kunnen de homologen in drie structurele onderklassen worden ingedeeld. De aanwezigheid van sporen van sequentie-uitwisselingen in de homologen van verschillende *Solanum*-soorten geeft aan dat er uitwisseling tussen allelen heeft plaatsgevonden vóór het ontstaan van de verschillende soorten.

De genomische organisatie van het *Rx1/Gpa2*-cluster is verder geanalyseerd met behulp van de sequenties van verschillende *bacterial artificial chromosome* (BAC)-klonen die stukken DNA afkomstig uit *S. tuberosum* ssp. *andigena* en *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* bevatten. Deze BAC-klonen werden geassembleerd en *aligned* op basis van syntenische regio's. Dit zijn regio's die in de verschillende aardappelgenotypen dezelfde genetische lokatie hebben. De analyse toonde aan dat de sequenties in deze regio

een grote onderlinge afwijking laten zien, die toeneemt naarmate de soorten waaruit deze sequenties afkomstig zijn, minder nauw aan elkaar verwant zijn. De aanwezigheid van een familie van geconserveerde genen (met homologie aan RING-zinkvingergenen) in de omgeving van de *Rx/Gpa2*-homologen laat zien dat deze genen samen met de resistentiegenhomologen zijn gedupliceerd (tandemduplicatie).

Tot slot

De hier beschreven resultaten leveren een bijdrage aan het onderzoek naar *R*-gen-evolutie. De oeroude oorsprong van het *Rx*-gen is een sterke aanwijzing voor de evolutie van dit gen volgens de loopgravenoorloghypothese. Ook laat dit onderzoek zien, dat de zoektocht naar belangrijke *R*-genen in de verwante wilde soorten een groot potentieel voor de gewasbescherming bevat. Verder zijn de homologen-datasets en hun gedetailleerde analyses belangrijk voor een vervolgonderzoek naar een structurele en functionele analyse van *Rx1* en *Gpa2*.

Stelling

Op dit moment verdwijnen er naar schatting dertigduizend soorten per jaar door toedoen van menselijke activiteiten (Leaky and Lewin, *The sixth extinction*). Gezien de grote diversiteit aan herkenningsspecificiteiten van resistentiegenen, in combinatie met een lage frequentie per specificiteit, zouden genenbanken van aan landbouwgewassen verwante soorten moeten worden uitgebreid met deze voor de landbouw zeer waardevolle resistentiegenen.

PROMOTIES