

# Genetische analyse van *Phytophthora infestans*

Theo A.J. van der Lee

Op 3 oktober 2003 promoveerde Theo van der Lee aan de Wageningen Universiteit op een proefschrift getiteld 'Genetic analysis of *Phytophthora infestans*'. Promotor was Prof.dr.ir. P.J.G.M. de Wit en co-promotor Dr.ir. F. Govers, beiden werkzaam bij de leerstoelgroep Fytopathologie van Wageningen Universiteit. Het onderzoek dat plaatsvond bij bovengenoemde leerstoelgroep, maakte deel uit van een biotechnologisch onderzoekprogramma uitgevoerd door de Associatie van Biotechnologische Onderzoekscholen in Nederland (ABON) en gefinancierd door de ministeries van Economische Zaken, Onderwijs, Cultuur en Wetenschappen, en Landbouw, Natuurbeheer en Visserij. De volledige tekst van het proefschrift is als pdf file beschikbaar op [www.gcw.nl](http://www.gcw.nl).

die verantwoordelijk zijn voor deze stammen-specifieke (a)virulentie in *P. infestans*. Dit is dan ook één van de kernpunten van dit proefschrift.

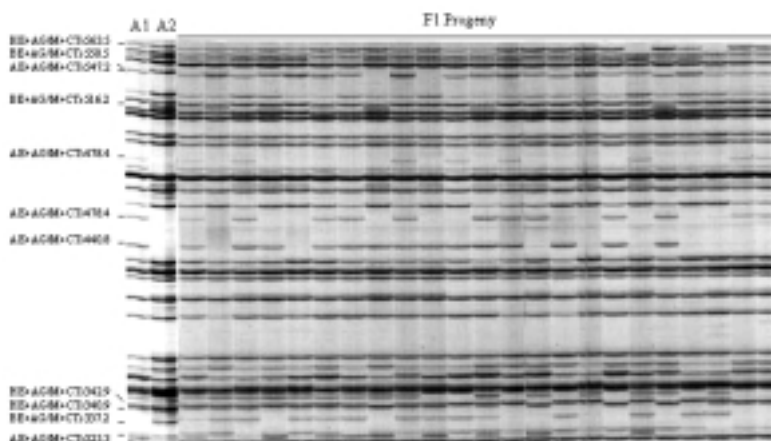
## Een AFLP koppelingskaart van *Phytophthora infestans*

Door het DNA van twee ouderstammen en hun geslachtelijke nakomelingen te karakteriseren aan de hand van zogenaamde vingerafdrukken, en DNA fragmenten die uitsplitsen in het nakomelingenschap (merkers) te analyseren is het mogelijk om de overerving van genen en merkers in kaart te brengen (Figuur 1). Het proefschrift begint met een technische beschrijving van AFLP als methode om een dergelijke vingerafdruk van het DNA van *P. infestans* te maken.

## Inleiding

Het proefschrift beschrijft genetisch onderzoek aan *Phytophthora infestans*, de veroorzaker van de aardappelziekte. Deze ziekte leidde tot desastreuze opbrengstverliezen in 1845 met als gevolg dat zich een hongersnood ontwikkelde die ruim één miljoen mensen in West Europa, met name in Ierland, het leven zou kosten. Nog steeds is de aardappelziekte één van de meest gevreesde plantenziekten. De jaarlijkse wereldwijde schade wordt geschat op drie miljard dollar en in Nederland wordt 50% van de chemische gewasbeschermingsmiddelen ingezet om deze ziekte te bestrijden. Omdat *P. infestans* zo'n groot probleem vormt voor de aardappelteelt is de afgelopen decennia veel onderzoek verricht aan *P. infestans* en aan natuurlijke resistentie tegen deze ziekteverwekker in verwante soorten van aardappel. Helaas zijn de tot nu toe gebruikte resistenties alleen effectief gebleven tegen specifieke stammen van *P. infestans*. Stammen die in staat zijn de resistentie te omzeilen zijn virulent en stammen die niet in staat zijn een aardappelplant met het betreffende resistentiegen aan te tasten worden avirulent ge-

noemd. Het gebruik van deze stammen-specifieke resistentie in aardappel kent grote beperkingen. In het veld zijn meestal meerdere *P. infestans* stammen aanwezig, waaronder virulente stammen die zich razendsnel kunnen vermeerderen en zware schade aan het gewas kunnen toebrengen. Hoe *P. infestans* zich onder natuurlijke omstandigheden aanpast aan resistente aardappelrassen is onduidelijk en ook is weinig bekend over de overerving van de genen



Figuur 1. AFLP-DNA vingerafdrukken van *Phytophthora infestans*. In de laan gemarkeerd met A1 is de vingerafdruk van de A1 ouderstam 80029 zichtbaar, in laan A2 de vingerafdruk van de A2 ouderstam 88133. De 24 lanen gemarkeerd met 'F1 progeny' zijn AFLP-DNA vingerafdrukken van 24 geslachtelijke nakomelingen van de twee ouderstammen. Links staan de codes van de merkers die uitsplitsen in de nakomelingen.

PROMOTIE

De AFLP methode heeft een hoog onderscheidend vermogen en is reproduceerbaar: klonale vegetatieve nakomelingen die werden gegenereerd van zoösporen afkomstig van de twee stammen die gebruikt zijn als ouders voor een kruising, bleken identieke DNA vingerafdrukken te hebben. Deze analyse liet ook zien dat de ouders genetisch uniform zijn hetgeen belangrijk is voor het overervingsonderzoek. Als in de nakomelingen DNA merkers vaker dan op grond van toeval verwacht mag worden, samen voorkomen zijn deze merkers aan elkaar gekoppeld. Zo werd de eerste genetische koppelingkaart van *P. infestans* gemaakt bestaande uit 190 DNA merkers verdeeld over tien samengestelde en zeven ouder-specifieke koppelingsgroepen. Het A1 paringstype bleek dominant te zijn over het A2 paringstype en merkers die exclusief gekoppeld zijn met het A1 paringstype komen veel vaker voor (7:1) dan op grond van toeval verwacht mag worden (1:1).

## Het karteren van avirulentiegenen

De koppelingkaart werd vervolgens gebruikt om stammen-specifieke avirulentiegenen te positioneren. Om merkers te vinden die nauw gekoppeld zijn met avirulentie werd DNA van, enerzijds, een aantal avirulente nakomelingen en, anderzijds, een aantal virulente nakomelingen bij elkaar gevoegd. Vervolgens werden de vingerafdrukken van deze verzamelde DNA monsters met elkaar vergeleken. In totaal werd voor vijf avirulentiegenen koppeling met ruim 25.000 AFLP fragmenten bekeken. Voor één avirulentiegen werden geen verzamelde DNA monsters geanalyseerd maar werd alleen gekeken naar koppeling met willekeurige merkers. Voor deze zes genen bleek, zoals verwacht, avirulentie dominant te zijn over virulentie. Voor alle zes werden ge-

koppelde merkers gevonden waarmee ze geplaatst konden worden op de genetische kaart: *Avr1* op koppelingsgroep IV, *Avr2* op VI, *Avr4* op A2-a, en *Avr3*, *Avr10* en *Avr11* als een cluster op koppelingsgroep VIII (Figuur 2).

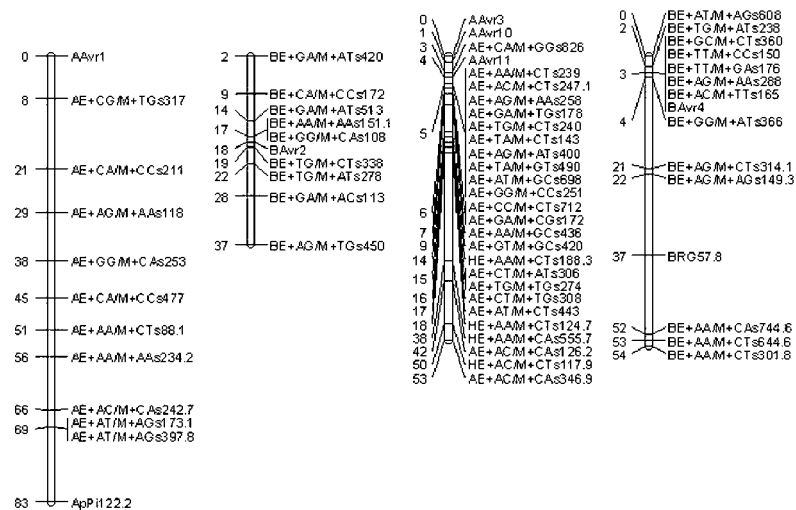
## Fysische kartering van een avirulentie locus

Hoofdstuk vier van het proefschrift beschrijft de constructie van een bank van grote DNA fragmenten van één van de nakomelingen uit de kruising beschreven in hoofdstuk twee. Deze nakomeling is virulent op het ras Bintje, één van de meest gebruikte aardappelrassen in Nederland, maar is niet virulent op aardappelrassen met de resistentiegenen R1, R2, R3, R4, R10 of R11 en zal daarom de zes corresponderende avirulentiegenen bevatten. De grootte van de gekloonde DNA fragmenten en de representatie van verschillende regio's van het genoom in deze bank worden beschreven. Tevens wordt er een vergelijking gemaakt tussen de fysische en de genetische afstand in de chromosoomregio

waar het *Avr3-Avr10-Avr11* cluster geïdentificeerd is. Tenslotte worden de mogelijkheden besproken om deze avirulentiegenen te identificeren uitgaande van hun positie op de genetische koppelingkaart.

## Analyse van de *Avr3-Avr10-Avr11* cluster in veldisolaten

Hoofdstuk vijf beschrijft een nadere karakterisering van de chromosoomregio waarop het *Avr3-Avr10-Avr11* cluster ligt. De regio werd geanalyseerd in twee kruisingspopulaties en in een groot aantal veldisolaten uit verschillende jaren en regio's. Deze analyse werd gestart toen bleek dat, tegen de verwachting in, negentien nauw gekoppelde merkers zich op hetzelfde chromosoom bevonden als het *Avr3-Avr10-Avr11* avirulentiegen cluster. Dit wijst op een chromosomale deletie op het zusterchromosoom maar dat is met AFLP merkers moeilijk te bepalen. Daarom werden de merkers nader gekarakteriseerd zodat ook analyse van de complementaire regio mogelijk zou worden. Veel merkers bleken gerepeteerde sequenties te



Figuur 2. Genetische kaarten van koppelingsgroepen met avirulentiegenen. Rechts staan de merkers, links de cumulatieve kaartafstanden in centiMorgans. (A) Koppelingsgroep IV met *Avr1*. (B) Koppelingsgroep VI met *Avr2*. (C) Koppelingsgroep VII met *Avr3-Avr10-Avr11*. (D) Koppelingsgroep A2-a met *Avr4*.

PROMOTIE

bevatten en konden daarom niet omgezet worden in een benodigde unieke merker. Enkele merkers waaronder M5.1 bleken wel uniek. Voor merker M5.1 was geen complementair stuk DNA in de virulente ouder te vinden: de M5.1 regio bleek alleen aanwezig te zijn in de avirulente ouder en in avirulente nakomelingen. Dit geeft aan dat er in de virulente ouder inderdaad een deletie voorkomt en dat deze deletie ook op één van de twee chromosomen van de avirulente ouder voorkomt. In een groot gedeelte van de veldisolaten (37%) werd ook een deletie in deze chromosoomregio gevonden en er is een duidelijke correlatie tussen de afwezigheid van merker M5.1 en de virulentie op aardappellijnen met de resistentiegenen R3, R10 of R11. De correlatie met virulentie was het hoogst op aardappellijnen met het resistentiegen R11, een gen dat in tegenstelling tot de resistentiegenen R3 en R10, nooit in populaire aardappelrassen werd geïntroduceerd, zodat de *P. infestans* populatie zich daaraan niet kon aanpassen. Mogelijk is virulentie voor R11 in *P. infestans* meegelift met selectie voor virulentie op aardappelrassen met R3 en R10. Dit heeft grote gevolgen voor veredelingsstrategieën die erop gericht zijn duurzame resistentie te verkrijgen door het stapelen of mengen van resistentiegenen.

### Trisomie nakomelingen en chromosoomtranslocaties

In hoofdstuk zes wordt de overerving van DNA merkers in twee kruisingspopulaties beschreven. Er werden twee koppelingskaarten met een hoge merkerdichtheid gegenereerd. De eerste koppelingskaart is een uitbreiding en verfijning van de in hoofdstuk twee beschreven koppelingskaart en bestaat uit 508 merkers verdeeld

over dertien samengestelde en tien ouder-specifieke koppelingsgroepen. Door het grotere aantal merkers komt de clustering van merkers, met name van dezelfde ouder of hetzelfde chromosoom, veel prominenter naar voren dan bij de eerste kaart. Ook laat de kaart een discrepantie zien tussen de beide ouders in de koppeling van merkers op koppelingsgroep III hetgeen wijst op een translocatie op dit chromosoom. De tweede kaart, gebaseerd op de koppelingsanalyse van een andere kruising, is meer gefragmenteerd. Toch kan een aantal koppelingsgroepen van beide kaarten geïntegreerd worden op basis van AFLP merkers met dezelfde mobiliteit en intensiteit. In het algemeen komen de merkers in dezelfde volgorde voor en op vergelijkbare afstanden, maar in een aantal gevallen zijn grote afwijkingen geconstateerd hetgeen wederom wijst op chromosoomtranslocaties. Gedetailleerde analyse van de nakomelingen laat bovendien zien dat een deel van de nakomelingen trisoom is: zij bevatten drie in plaats van de gebruikelijke twee homologe chromosomen. Deze trisome nakomelingen zijn kennelijk niet beperkt in vitaliteit omdat ze nog steeds in staat zijn aardappelplanten aan te tasten. De frequentie van trisomen in twee onafhankelijke nakomelingschappen wijst er op dat het voorkomen van trisomen geen uitzonderlijke gebeurtenis is.

### Conclusies en voortuitblik

Dit onderzoek heeft geresulteerd in de eerste gedetailleerde genetische koppelingskaart van *P. infestans*. Ook heeft het laten zien dat overerving in *P. infestans* niet altijd volgens verwachting verloopt. De aangetoonde trisomen, deleties en chromosoomtranslocaties wijzen op een aanzienlijke flexibiliteit van het genoom. Waarschijnlijk komen trisomen ook voor in veldisolaten

en zijn mogelijk mede bepalend voor de genetische variabiliteit van de *P. infestans* populatie. Het onderzoek onderstreept de noodzaak om bij resistentietoetsen altijd meerdere *P. infestans* isolaten te testen en om de samenstelling van de veldpopulatie voortdurend te blijven volgen.

De merkers en de genetische koppelingskaart vormen een uitstekende basis voor verder onderzoek. De leerstoelgroep Fytopathologie richt zich nu op het kloneren van avirulentiegenen, o.a. op basis van hun positie op de koppelingskaart (positionele klonering). Een beter inzicht in de werking van avirulentiegenen is belangrijk: waarom kunnen deze genen in *P. infestans* zo snel muteren en hoe leidt mutatie tot het omzeilen van herkenning door resistentie-eiwitten? De uitdaging voor de toekomst is om deze kennis optimaal te benutten voor nieuwe veredelingsstrategieën die leiden tot duurzaam resistente aardappelcultivars.

### Literatuur

- Lee, T. van der, De Witte, I., Drenth, A., Alfonso, C. and Govers, F. (1997) AFLP linkage map of the oomycete *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetics and Biology* **21**, 278-291.
- Lee, T. van der, Robold, A., Testa, A., van 't Klooster, J.W. and Govers, F. (2001) Mapping of avirulence genes in *Phytophthora infestans* with Amplified Fragment Length Polymorphism Markers selected by bulked segregant analysis. *Genetics* **157**, 949-956.
- Lee, T. van der, Testa, A., van 't Klooster, J., van den Berg-Velthuis, G. and Govers, F. (2001) Chromosomal deletion in isolates of *Phytophthora infestans* correlates with virulence on R3, R10 and R11 potato lines. *Molecular Plant Microbe Interactions* **14**, 1444-1452.
- Lee, T. van der, Testa, A., Robold, A., van 't Klooster, J.W. and Govers, F. (2004) High density genetic linkage maps of *Phytophthora infestans* reveal trisomic progeny and chromosomal rearrangements. Accepted for publication pending minor revisions.
- Whisson, S.C., van der Lee, T., Bryan, G.J., Waugh, R., Govers, F. and Birch, P.R.J. (2001) Physical mapping across an avirulence locus of *Phytophthora infestans* using a high representation, large insert bacterial artificial chromosome library. *Molecular and General Genomics* **266**, 289-295.