

University of Groningen

Characterization of the Tm-2² locus of tomato and its durability

Rasul, Ijaz

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2012

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Rasul, I. (2012). *Characterization of the Tm-2² locus of tomato and its durability*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting

Onderzoek aan *Arabidopsis thaliana* is een belangrijk onderwerp geworden binnen de planten biologie. Voorheen lag de focus van het onderzoek meer op andere plantensoorten zoals tomaat en tabak door het economische belang van deze soorten. Om deze reden zijn ziektes van deze plantensoorten ook intensief onderzocht.

Tobamo virussen zijn veelvoorkomende ziekteverwekkers op diverse gewassen. Het Tomaten/Tabaks Mozaiek Virus (ToMV/TMV) was het eerste gekarakteriseerde tobamo virus. De infecties door deze virussen worden gekenmerkt door mozaïek patronen op de bladeren en een groei remmende werking op de gastheerplant. Dit resulteert in grote economische en cosmetische schade in deze voor de land- en tuinbouw belangrijke gewassen.

Ter bescherming tegen ziekteverwekkers hebben planten twee verschillende strategieën ontwikkeld gedurende de evolutie. Deze zijn beschreven in **Hoofdstuk 1**. De eerste strategie bestaat uit het passief tegenhouden van de pathogenen door barrières, zoals celwanden, trichomen, waslaagjes en haren op het blad en de stengel. De tweede strategie bestaat uit detectie en herkenning van het pathoogeen en het activeren van specifieke beschermingsmethoden. Deze strategie is verder onder te verdelen in de volgende drie defensie types: 1) natuurlijke immuniteit (niet-gastheer specifieke resistentie); 2) pathoogeen en gastheer specifieke resistentie; 3) post-transcriptionele gen suppressie.

De natuurlijke immuniteit verwijst naar de niet-gastheer specifieke resistentie die gericht is tegen algemene microbiële componenten die bekend staan als 'pathogen-associated molecular patterns' (PAMPs). Dit zijn veelal derivaten van algemeen voorkomende componenten in pathogenen. Herkenning van deze componenten vindt meestal buiten de cel plaats door gespecialiseerde aan de plasmamembraan verankerde receptoren die bekend staan als 'pathogen recognition receptors' (PRRs). Deze PRRs zijn onderverdeeld in twee typen, 'receptor-like kinases' (RLKs) en 'receptor-like proteins' (RLPs). Dit type van bescherming wordt ook wel 'PAMPs triggered immunity' (PTI) genoemd.

De pathoogeen en gastheer specifieke resistentie is afhankelijk van specifieke avirulentie (Avr) genproducten van het pathoogeen en de herkenning daarvan door

specifieke gastheer resistentie (R) genproducten. De interactie tussen de Avr en R genproducten kan zowel plaatsenvinden binnen als buiten de cel. De Avr genproducten staan ook bekend als effectoren en de resistentie veroorzaakt door de R genen wordt dan ook wel ‘effectors-triggered immunity’ (ETI) genoemd. Deze is robuust en sneller dan de PTI en wordt meestal gekarakteriseerd door een hypersensitieve respons (HR) in planten.

Post-transcriptionele gen suppressie is ook een niet gastheer specifieke bescherming, want er zijn geen pathogeen herkende eiwitten van de gastheer nodig. Dit mechanisme werkt door de herkenning van RNA moleculen van het pathogeen door gebruik te maken van 21-23 nucleotide RNA moleculen afkomstig van dubbelstrengs RNA van pathogenen.

Beide types niet-gastheer specifieke verdediging (natuurlijke immuniteit en post-transcriptionele gen suppressie) zijn niet in staat planten te beschermen tegen tobamo-virus infecties. Om die reden heeft onderzoek naar resistenties gebaseerd op Avr en R eiwitten meer aandacht gekregen en wordt de kennis vergroot op het gebied van resistentie tegen plantenvirussen. Er zijn nu vier ToMV resistentie genen, één van tabak (*N*) en drie van tomaat (*Tm-1*, *Tm-2* en *Tm-2²*), geïsoleerd, gekarakteriseerd en transgeen tot expressie gebracht in zowel tabak als tomaat. De *N* en *Tm-1* genen waren alleen effectief tegen het ToMV-O (wild type) virus. In vergelijking tot deze resistenties heeft het *Tm-2* gen het langer volgehouden, maar deze werd door co-evolutie van het virus met het resistentie gen uiteindelijk ook doorbroken. Het *Tm-2²* gen geeft al bijna 5 decennia resistentie tegen de meeste tobamo virussen. ToMV isolaten die deze resistentie toch konden doorbreken waren kreupel. Beide resistentiegenen, *Tm-2* en *Tm-2²* zijn allelisch en hun R eiwitten delen ook een gezamenlijke Avr-factor, het ‘movement protein’ (MP) van ToMV. Beide genproducten behoren tot de grote groep van CNL (CC-NBS-LRR) type R eiwitten. Ze verschillen slechts in vier aminozuren van elkaar. Deze differentierende aminozuren zijn verspreid over twee domeinen/regio’s (de NBS en de LRR), waarbij het derde domein (CC) compleet geconserveerd is gebleven. In vergelijking tot het *Tm-2²* eiwit zijn twee van deze mutaties (Ile/Phe and Met/Ile) gelokaliseerd in de NBS regio van het *Tm-2* eiwit en de andere twee (Tyr/Asn and Ser/Thr) zijn

gelokaliseerd in de LRR regio. Ondanks het kleine aantal veranderingen is het verschil in resistentie specificiteit opmerkelijk. De combinatie van deze drie aspecten, het delen van het MP als Avr eiwit, de verschillende locaties van de mutaties die nodig zijn om de resistentie te omzeilen en de verschillen in resistentie specificiteit, is fascinerend. De functies van de posities en de differentiele aminozuren tussen beide eiwitten zijn beschreven in de hoofdstukken 2 en 3. Domein wissel experimenten tussen de Tm-2 en Tm-2² genproducten zijn onderzocht (**Hoofdstuk 2**). De resultaten zijn consistent met de theorie dat het LRR domein betrokken is bij de specificiteit van het R eiwit door de herkenning van het Avr eiwit (de ToMV-MP). Het NBS domein lijkt betrokken te zijn bij signaal transductie en niet bij de herkenning van het pathogeen. Op deze manier is de vraag, gerelateerd aan de locatie van de veranderde aminozuren, opgelost. Verder laat de plaats gerichte mutagenese zien dat, in de Tm-2 achtergrond, slechts één aminozuur verandering, tyrosine (Tyr) in plaats van asparagine (Asn), welke gelokaliseerd is in het LRR domein, verantwoordelijk is voor de Tm-2² resistentie specificiteit (**Hoofdstuk 3**). Hoewel in hetzelfde gebied een ander aminozuur verandering, serine (Ser) in plaats van threonine (Thr), ook een beperkte rol speelt in de herkenning van het ToMV-MP.

De functionele expressie van het Tm-2² gen is onderzocht in twee plantensoorten (tomaat en tabak) uit dezelfde *Solanaceae* familie. De overdracht van de duurzame resistentie van het *Tm-2²* gen naar andere soorten of families kan waardevol zijn. De extra-familie overdracht van het Tm-2² gen naar *Arabidopsis thaliana*, welke behoort tot de *Brassicaceae*, is beschreven in **Hoofdstuk 4**. Deze modelplant is erg bruikbaar om virus-plant interacties te kunnen onderzoeken. Een ecotype van *Arabidopsis*, Col-0, is getransformeerd en geanalyseerd op resistentie en het tijdsinterval tot een systemische virus infectie. TMV-Cg is een robuust en snel inficerend virus isolaat. Al de geteste *Arabidopsis* ecotypes, inclusief de transgene, raakten hiermee binnen 9 dagen systemisch geïnfecteerd. Col-0/*Tm-2²* transgene planten lieten een vertraging van 10 dagen zien tot een systemische infectie van het *Tm-2* resistentie brekende virus, waar het *Tm-2²* resistentie brekende virus 4 dagen extra nodig had om de plant systemisch te infecteren. Dit suggereert dat het Tm-2²

eiwit het infectieproces vertraagt, maar niet in staat is om een volledige resistentie te bewerkstelligen. Dit laat tevens zien dat het *Tm-2²* gen wel tot expressie wordt gebracht in *Arabidopsis*. Verder laat deze studie zien dat de interactie van het R eiwit met gastheer factoren, bijvoorbeeld een bewaker van ‘down-stream’ signaal elementen, waarschijnlijk belangrijk is voor het optimaal functioneren van het R eiwit.

Het *Tm-2²* gen was ongeveer 5 decennia geleden geïntroduceerd in gecultiveerde tomaten en nog steeds geeft deze resistentie tegen ToMV. Het blijft echter noodzakelijk om door te gaan met zoeken naar nieuwe homologe resistenties van buiten de agrarische genen pool om resistentie bronnen te vinden voor een variëteit van ToMV isolaten. Om dit te kunnen bewerkstelligen werden 17 *Solanum* soorten onderzocht op hun resistentie specificiteit tegen *Tm-2* and *Tm-2²* resistentie doorbrekers. (**Hoofdstuk 5**). Op basis van deze virus infectie toetsen, werden er zes genotypen geselecteerd voor verder moleculair onderzoek. Hierbij werd gebruik gemaakt van PCR amplificatie gevolgd door DNA sequentieanalyse van de *Tm2²* homologen. De genen van alle zes genotypen konden worden geïsoleerd. Drie van deze *Tm-2²* homologen, *Sptm-3*, *Satm-2* en *Sctm-2*, geïsoleerd uit *S. peruvianum*, *S. arcanum* en *S. chilense*, lieten geen resistentie zien. Twee *Tm-2²* homologen, *ShTm-2* (*S. huaylasense*) en *SpiTm-2* (*S. pimpinellifolium*) lieten een vergelijkbare resistentie zien als het *Tm-2* gen. Het gen *ScoTm-2²* (*S. corneliomulleri*) liet een *Tm-2²* gelijkende resistentie zien en lijkt het meest op het *Tm-2²* gen, maar heeft een verkort eiwit door een 32 bp insertie. Het eiwit is 86 aminozuren korter aan de C uiteinde van het LRR gebied in vergelijking met het 861 aminozuren lange *Tm-2²* eiwit. Dit ingekorte gen product van *S. corneliomulleri* kan van waarde zijn als toevoeging aan de aanwezige TMV resistenties.

Voor toekomstig onderzoek kunnen de resultaten van de extra-familie *Tm2²* gen verplaatsing in combinatie met de ingekorte *Tm2²* gen homoloog van belang zijn. Dit kan de TMV resistentie genen pool vergroten en kan eveneens leiden tot een beter begrip van interacties tussen plant en virus.