



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Multiple faces of *Fusarium oxysporum* effector protein Avr2

Di, X.

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Di, X. (2017). Multiple faces of *Fusarium oxysporum* effector protein Avr2.

General rights

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), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

Summary

Fusarium oxysporum (*Fo*) is one of the top ten fungal pathogens worldwide (Dean et al., 2012). It causes vascular wilt disease in over 120 different plant species, including the economically important crops banana, cotton, melon, tomato and the weed *Arabidopsis* (Michiels and Rep, 2009). Individual isolates of *Fo* usually cause disease on a narrow range of host plant species or on a single species only. Based on this observation isolates of this plant pathogenic fungus have been classified into *formae speciales*, each *formae specialis* (f.sp.) is named after the specific plant species it infects (Michiels and Rep, 2009). **Chapter 2** provides an overview on the role of the major phytohormones in the interaction between various *formae speciales* of *Fo* and their specific hosts. A model is presented in which Salicylic Acid (SA) signaling reduces susceptibility of the host to *Fo*. The effects of Jasmonic Acid (JA), Ethylene (ET), Abscisic Acid (ABA) and auxin, however, are more complex and differ between pathosystems. We speculate that the latter phytohormone-signaling pathways may be hijacked by *Fo* for host manipulation. Ultimately, the mechanisms are discussed on how plant hormones and *Fo* effectors balance the plant-fungus interaction from beneficial to pathogenic and *vice versa*.

The remainder of the thesis is focused on *Fo* f.sp. *lycopersici* (*Fol*), a soil-borne and xylem-colonizing pathogen, that causes vascular wilt disease in tomato (*Solanum lycopersicum*) only. In **Chapter 3** the role of the major phytohormone signaling pathways in tomato towards susceptibility to *Fol* is studied. Bioassays of SA, ET and JA deficient mutants of tomato were performed with wild-type *Fol* or the less pathogenic *Fol* Δ *Avr2* strain. It was found that impaired SA signaling enhances *Fol* disease symptoms, whereas ET is responsible for promoting disease development. JA might be manipulated by the *Fol* effector protein *Avr2* and was found to play a role in the ability of the fungus to colonize tomato. Finally, a model for the role of SA, ET and JA signaling in susceptibility of tomato to *Fol* is proposed and compared to that in *Arabidopsis*. The function of the ET, SA and JA in susceptibility to *Fo* seems broadly conserved between *A. thaliana* and tomato.

Upon colonization *Fol* secretes over 14 proteins called Six (Secreted in xylem) proteins in the xylem sap of infected tomato plants (Rep et al., 2005; Houterman et al., 2007). One of these, notably Six3 (*Avr2*), is not only required for full virulence, but functions as an Avirulence (*Avr*) protein as well: it triggers *Fol* resistance in the host that is mediated by the *Avr2*-matching Resistance (*R*) protein I-2 (Houterman et al., 2009). To get insights into its virulence function, *Avr2* was heterologously expressed in tomato plants in **Chapter 4**. Pathogenicity of an *Avr2* knockout *Fol* (*Fol* Δ *Avr2*) strain was fully restored in transgenic tomato lines that produce either secreted (*Avr2*) or cytosolic *Avr2* (Δ *spAvr2*) protein. The latter suggests that although *Avr2* was isolated from the xylem

sap it exerts its virulence functions inside the host cell. This implies that secreted Avr2 is taken up from the extracellular spaces. In addition, evidence has been obtained that Avr2 uptake is not a host autonomous process, and that both *Fol* and *Agrobacterium*, but not *Verticillium dahliae*, facilitates Avr2 uptake by tomato cells from extracellular spaces. Based on these results, we propose a novel strategy (Takken et al., 2016) to confer disease resistance in plants.

In **Chapter 5** transgenic tomato plants producing Avr2 were found to become hypersusceptible towards non-related plant pathogens and have a compromised PAMP triggered-immunity. Suppression of PTI might be the main virulence function of Avr2 and provides insight in the processes targeted by the effector. A structure-guided Avr2 mutagenesis approach was used to determine, in some detail, the regions in the protein involved in its virulence and avirulence function. The results confirmed the idea that these two functions can be uncoupled and are conferred by distinct regions on the protein.

The results described in this thesis are summarized in **Chapter 6**. A model for the role of Avr2 in susceptibility and I-2 mediated resistance is proposed. To further extend the proposed model the Avr2 host target should be identified. Its identification will lead to a better understanding of the function of Avr2 in virulence and possibly in I-2-mediated resistance during *Fol* infection.

References

- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., et al. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 13, 414-430. doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x.
- Houterman, P. M., Ma, L., van Ooijen, G., de Vroomen, M. J., Cornelissen, B. J. C., Takken, F. L. W., et al. (2009). The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *Plant J* 58, 970-978. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03838.x.
- Houterman, P. M., Speijer, D., Dekker, H. L., C.G., d. K., Cornelissen, B. J. C., and Rep, M. (2007). The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. *Mol Plant Pathol* 8, 215-221. doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00384.x.
- Michielse, C. B., and Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Pathol* 10, 311-324. doi: 10.1111/j.1364-3703.2009.00538.x.
- Rep, M., Meijer, M., Houterman, P. M., van der Does, H. C., and Cornelissen, B. J. C. (2005). *Fusarium oxysporum* evades I-3-mediated resistance without altering the matching avirulence gene. *Mol Plant Microbe In* 18, 15-23. doi: 10.1094/MPMI-18-0015.
- Takken, F. L. W., Di, X., and van den burg, H. A. (November 2016). Plants comprising pathogen effector constructs. the Netherlands patent application EP16201553.1.

Samenvatting

Fusarium oxysporum (*Fo*) staat in de wereldwijde top-tien van schimmels die in staat zijn planten ziek te maken (Dean et al., 2012). Het pathogeen veroorzaakt verwelkingsziekte in ruim 120 verschillende plantensoorten, waaronder het onkruid *Arabidopsis* (in het Nederlands: Zandraket) en economische belangrijke gewassen zoals banaan, katoen, meloen en tomaat (Michielse and Rep, 2009). Ondanks het grote aantal *Fo* gastheren kan een individueel isolaat slechts een, of enkele, plantensoorten infecteren. Op basis hiervan wordt de schimmel ingedeeld in zogenoemde *formae speciales*. Elke *forma specialis* (f.sp.) is vernoemd naar de specifieke waardplant waarin deze schimmel ziekte veroorzaakt (Michielse and Rep, 2009).

Hoofdstuk 2 geeft een overzicht van de rol van de belangrijkste plantenhormonen in de interactie tussen de verschillende *formae speciales* van *Fo* en hun specifieke gastheren. Een model wordt gepresenteerd waarin Salicylzuur (SA) de vatbaarheid van een plant voor verlaagd. De rol van Jasminzuur (JA), Ethyleen (ET), abscisinezuur (ABA) en auxine zijn complexer en verschillen voor de verschillende pathosystemen. We speculeren dat de fytohormoon-signaleringsroutes gemanipuleerd worden door de schimmel om de gastheer te kunnen bespelen. Verder bespreken we mogelijke mechanismen hoe planthormonen en *Fo* effectoreiwitten de relatie tussen de plant en schimmel beïnvloeden. De relatie tussen *Fo* en een gastheer plant varieert van ziekmakend tot een wederzijds voordelige.

De rest van het proefschrift richt zich op *Fo* f.sp. *lycopersici* (*Fol*), een in de bodem voorkomende schimmel die de xylemvaten van tomatenplanten (*Solanum lycopersicum*) infecteert en daarbij verwelkingsziekte veroorzaakt. **Hoofdstuk 3** richt zich op de betrokkenheid van de eerder genoemde planthormonen bij de gevoeligheid voor *Fol* infectie. Planten met een defect in SA, ET of JA signalering werden geïnoculeerd met wild-type *Fol* of met de minder agressieve *Fol*Δ*Avr2* stam. Gevonden werd dat een verstoorde SA signalering de *Fol* ziekte symptomen versterkt, terwijl een verstoorde ET signalering de symptomen juist vermindert. JA signalering wordt mogelijk beïnvloed door het *Fol* effector eiwit *Avr2*. Daarnaast lijkt dit hormoon betrokken bij het vermogen van de schimmel om de plant te koloniseren. Op basis van de verkregen data wordt een model gepresenteerd met daarin aangegeven de rol van SA, ET en JA signalering in de vatbaarheid van tomaat voor *Fol*. Dit model wordt vergeleken met dat voor *Arabidopsis*; de rol van ET, SA en JA in gevoeligheid voor *Fo* lijkt grotendeels geconserveerd te zijn tussen beide plantensoorten.

Tijdens kolonisatie van de xylemvaten van een tomatenplant scheidt de schimmel kleine eiwitten uit in het xylemsap. Uit het sap van geïnfecteerde planten zijn inmiddels

14 van deze zogenaamde Six (Secreted in xylem) eiwitten geïsoleerd (Rep et al., 2005; Houterman et al., 2007). Een van deze eiwitten, Six3 (Avr2), heeft naast een virulentie functie (dwz het vermogen van de schimmel om de plant ziek te maken) ook een rol in avirulentie. Het Avr2 eiwit induceert onbedoeld een afweerrespons in tomatenplanten die het I-2 resistentie eiwit produceren (Houterman et al., 2009). Om inzicht te krijgen in de virulentie functie van Avr2 werd het eiwit heteroloog tot expressie gebracht in tomatenplanten. Zoals beschreven in **Hoofdstuk 4** kan plant-geproduceerd Avr2 eiwit, zowel wild type Avr2 als de cytosolische Δ spAvr2 variant, de virulentie van een Avr2 knockout *F. oxysporum* (*Fol* Δ Avr2) stam volledig complementeren. Dit betekent dat, hoewel Avr2 gevonden wordt in het xylemsap van de plant, het eiwit zijn functie uitoefent binnen in de cellen van de gastheer. Dit impliceert opname van het eiwit door de plantencel vanuit de extracellulaire ruimtes. Deze opname blijkt geen autonoom proces te zijn en de aanwezigheid van het pathogeen te vereisen. Gevonden werd dat zowel *Fol* als de bacterie *Agrobacterium*, maar niet de schimmel *Verticillium dahliae*, de opname van Avr2 door tomaten cellen kan faciliteren. Op basis van deze ontdekking is een patent ingediend (Takken et al., 2016) waarin een strategie wordt beschreven waarmee mogelijk een brede ziekteresistentie in planten verkregen zou kunnen worden.

In **Hoofdstuk 5** wordt beschreven dat transgene, Avr2 producerende tomatenplanten hyper-vatbaar zijn voor verschillende, niet gerelateerde, plant pathogenen. Daarnaast blijkt in deze Avr2 planten de PAMP geïnduceerde afweerresponse (PTI) verstoord te zijn. Het onderdrukken van deze PTI response lijkt een belangrijke virulentie functie van Avr2 te zijn. Deze ontdekking biedt aanknopingspunten om de specifieke processen te identificeren die verstoord worden door Avr2. Op basis van de recent opgehelderde eiwitstructuur is een structuur/functie analyse gedaan en zijn aminozuren geïdentificeerd die belangrijk zijn voor de virulentie en avirulentie functies van het eiwit. Gevonden werd dat beide functies ontkoppeld kunnen worden en op verschillende plaatsen in het eiwit gelokaliseerd zijn.

De resultaten van het proefschrift worden besproken in **hoofdstuk 6**. Hierin wordt een model gepresenteerd voor de rol van Avr2 in vatbaarheid en I-2-gemedieerde resistentie. Om dit model verder uit te bouwen is identificatie nodig van het planteneiwit dat gemanipuleerd wordt door Avr2. Karakterisatie van dit eiwit leidt waarschijnlijk niet alleen tot een beter begrip van de rol van Avr2 in virulentie, maar vergroot ook ons inzicht in de I-2-gemedieerde afweer tijdens *Fol* infectie.

Referenties

- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., et al. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 13, 414-430. doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x.
- Houterman, P. M., Ma, L., van Ooijen, G., de Vroomen, M. J., Cornelissen, B. J. C., Takken, F. L. W., et al. (2009). The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *Plant J* 58, 970-978. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03838.x.
- Houterman, P. M., Speijer, D., Dekker, H. L., C.G., d. K., Cornelissen, B. J. C., and Rep, M. (2007). The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. *Mol Plant Pathol* 8, 215-221. doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00384.x.
- Michielse, C. B., and Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Pathol* 10, 311-324. doi: 10.1111/j.1364-3703.2009.00538.x.
- Rep, M., Meijer, M., Houterman, P. M., van der Does, H. C., and Cornelissen, B. J. C. (2005). *Fusarium oxysporum* evades I-3-mediated resistance without altering the matching avirulence gene. *Mol Plant Microbe In* 18, 15-23. doi: 10.1094/MPMI-18-0015.
- Takken, F. L. W., Di, X., and van den burg, H. A. (November 2016). Plants comprising pathogen effector constructs. the Netherlands patent application EP16201553.1.