



**Duurzame Resistentie  
tegen Phytophthora  
in aardappel**



**DuRPh**  
halverwege



# Colofon

## **Duurzame resistentie tegen Phytophthora in aardappel door cisgene merkervrije modificatie.**

Programmateam DuRPh, juli 2010

Piet Boonekamp Bert Lotz

Anton Haverkort Geert Kessel

Ronald Hutten Richard Visser

Evert Jacobsen Jack Vossen

Bijdrage aan tekstkaders: Vivianne Vleeshouwers

Eindredactie: Erik Toussaint

Vormgeving: Wageningen UR, Communication Services

© 2010 Wageningen, Wageningen UR

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Wageningen UR.

Extra exemplaren van deze brochure kunnen via onderstaand adres worden besteld

Projectgroep DuRPh

p/a Plant Research International

Anton Haverkort

Postbus 616

6700 AP Wageningen

Internet

[www.durph.wur.nl](http://www.durph.wur.nl)

E-mail

[anton.haverkort@wur.nl](mailto:anton.haverkort@wur.nl)



# Introductie

Wereldwijd hebben aardappeltelers last van de zogenoemde aardappelziekte die veroorzaakt wordt door *Phytophthora infestans*. Boeren die geen biologische aardappels verbouwen en het zich financieel kunnen veroorloven, behandelen hun gewas gemiddeld vijftien keer per jaar met een chemisch middel dat de aardappelplanten moet beschermen tegen *Phytophthora*. Biologische telers zijn grotendeels afhankelijk van het weer: het ene jaar hebben ze een redelijke opbrengst, het andere jaar komt er nauwelijks iets van het land door toedoen van *Phytophthora*.

Plantenveredelaars breken zich al tientallen jaren het hoofd over een oplossing voor dit probleem. Als het al lukt om een nieuw aardappelras te ontwikkelen met resistentie tegen *Phytophthora*, dan lukt het deze oömyceet tot nu toe heel snel om door die resistentie heen te breken. Oömyceten lijken op schimmels maar vormen taxonomisch een eigen groep omdat ze verschillen in de samenstelling van het DNA en de celwand.



Grootschalige teelt in ontwikkelde landen

In 2006 startte Wageningen UR (University & Research centre) daarom in opdracht van het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit het tienjarige onderzoekproject DuRPh (Duurzame Resistentie tegen *Phytophthora*). In dit project worden bestaande aardappelrassen door middel van 'cisgenese' resistent gemaakt tegen de aardappelziekte. Daarbij bouwen onderzoekers van Wageningen UR verschillende zogenaamde R-genen tegelijkertijd bij de aardappel in, waardoor de resistentie waarschijnlijk veel langer stand kan houden. De ambitie van het onderzoek is om het mogelijk te maken dat veredelingsbedrijven rassen kunnen (laten) ontwikkelen waarmee het gebruik van anti-*Phytophthora* middelen met 80% vermindert.

Het DuRPh project wordt gefinancierd vanuit de aardgasbaten, waarvan € 10 miljoen is vrijgemaakt voor een periode van 10 jaar (2006-2015).

Deze brochure geeft een beeld van de vorderingen van het onderzoek over de eerste vijf jaar. Daarnaast gaat zij in op een deel van de internationale problematiek: de beschikbaarheid van resistente aardappelrassen in de ontwikkelingslanden en ontwikkelde landen.



Kleinschalige teelt op de Filippijnen

# Toenemend belang aardappel in ontwikkelingslanden

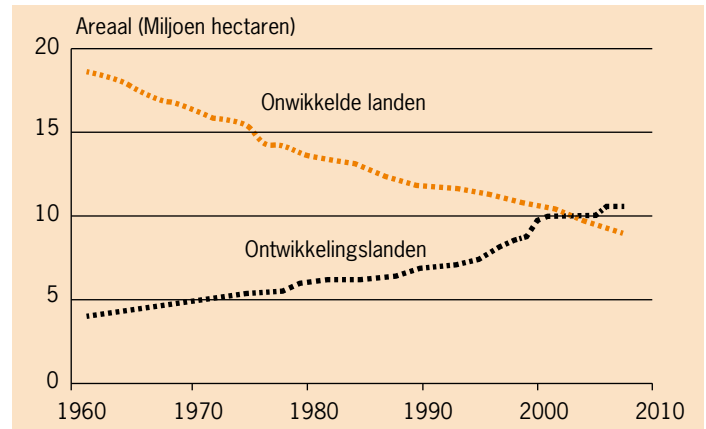
4

DuRPh

De aardappel wordt tegenwoordig in bijna alle landen van de wereld geteeld. Alleen in de gebieden waar de temperatuur het hele jaar door te hoog of te laag is kom je de aardappel niet tegen. In 2005 was het totale areaal ruim 20 miljoen hectare, goed voor een totale productie van ruim 320 miljoen ton aardappels. Uitgedrukt in verse productie is aardappel het derde gewas voor menselijke consumptie, na tarwe (630 miljoen ton) en rijst (608 miljoen ton).

Gedurende de laatste 40 jaar veranderde het aardappelareaal mondiaal nauwelijks. In ontwikkelde landen, met name in Oost-Europa, daalde het areaal. Dat werd gecompenseerd door een verdrievoudiging van het areaal in ontwikkelingslanden. Het aardappelareaal is daardoor in ontwikkelingslanden inmiddels groter dan in ontwikkelde landen. Dat is een trend die zich ook in de komende jaren zal doorzetten.

De afname van het aardappelareaal in Oost-Europa wordt veroorzaakt door twee andere trends. Ten eerste wordt de aardappel daar niet langer als diervoer gebruikt. Daarnaast hebben de bewoners het minder 'aardappel-rijke' consumptiepatroon van West Europa overgenomen.



In ontwikkelingslanden is de aardappel juist prominenter op het menu gekomen en is in Azië de mogelijkheid van winterteelt, tussen twee rijstteelten, breder opgepakt. Daarnaast is aardappel juist voor die landen een aantrekkelijker gewas geworden, omdat aardappelplanten water en voedingsstoffen goed benutten en aardappeltelers steeds meer beschikken over goed pootgoed en agrochemische producten.



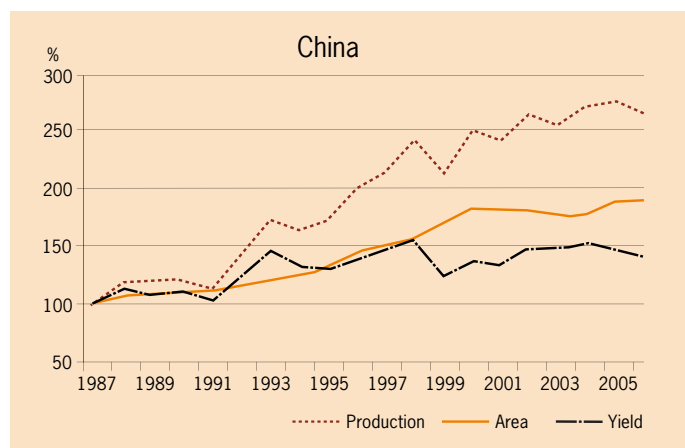
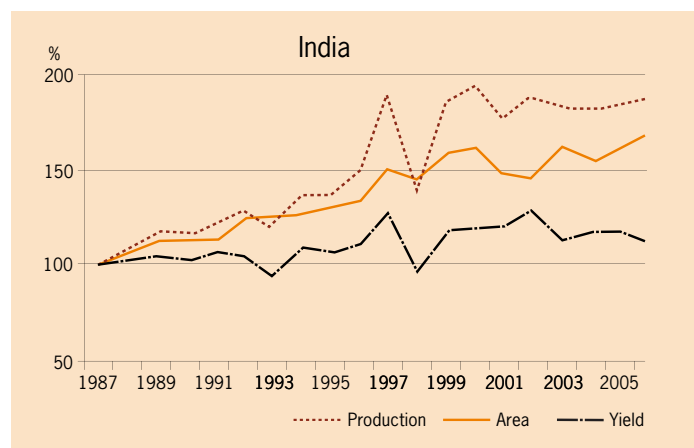
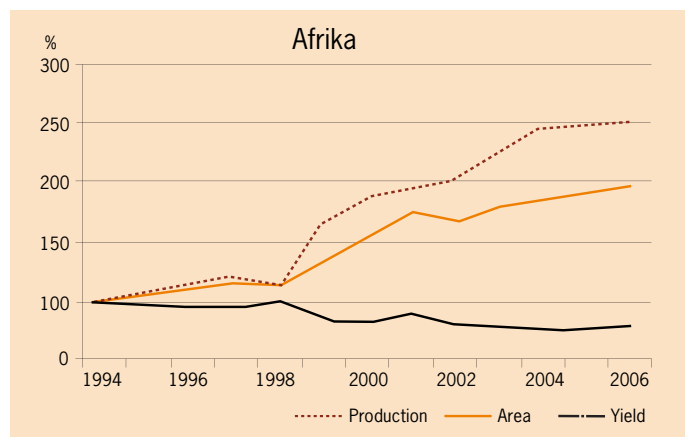
Aardappelconsumptie friet



Thuismaaltijd



Deze grafieken laten zien dat de aardappelproductie in ontwikkelingslanden snel stijgt. In Afrika komt die toename vooral door de areaaltoename. De opbrengst per hectare is er juist gedaald. De areaalstijging in Afrika is spectaculair: in de landen Ethiopië, Kenia, and Oeganda nam het areaal toe van 160 000 ha in 1986 tot meer dan 300 000 ha in 2006. In Rwanda steeg het areaal in dezelfde periode zelfs van minder dan 100 000 tot meer dan 250 000 ha. Hier is de aardappel volksvoedsel, net als in Burundi en in Kivu in Kongo.



Aardappelarealen en productie in drie ontwikkelingsgebieden (FAO-data, 1994 of 1987 = 100%).

Afrika beneden de Sahara 1.1 miljoen ha x 7.7 t/ha = 8 m ton.

India 1.4 miljoen ha x 17.1 t/ha = 24 m ton.

China 5 miljoen ha x 14 t/ha = 70 m ton.



# De reis van de aardappel en de aanval van Phytophthora

6

DuRPh

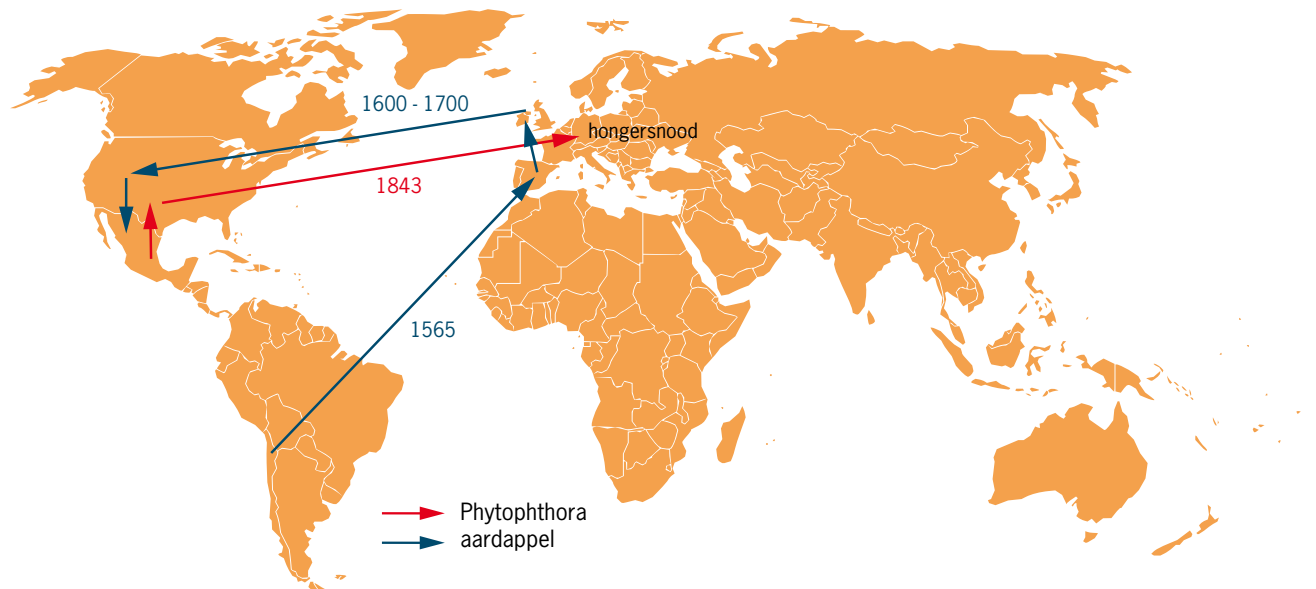
Meer dan 400 jaar geleden is de aardappel door de Spanjaarden vanuit Amerika naar Europa gebracht. In noordelijke streken heeft de aardappel daarna granen als belangrijkste voedsel verdrongen. De oömyceet *Phytophthora infestans*, verwekker van de aardappelziekte, kwam niet meteen mee. Daar zijn verschillende mogelijke redenen voor. Wellicht kwam de ziekte nog niet voor in Peru, het gebied waar onze aardappels vandaan zijn gekomen. Wellicht zijn de aangetaste knollen onderweg volledig verrot, waardoor ze niet meer op het land terecht kwamen. Het kan ook zijn dat de introductie van de aardappel in Europa via zaad plaatsvond, daar is geen zekerheid over.

Via Europa is de cultuuraardappel ook in Noord-Amerika terecht gekomen. In Mexico kwamen ook toen al veel wilde aardappelsoorten voor, zoals *Solanum demissum*,

*S. bulbocastanum* en *S. edinense*. Deze soorten waren al duizenden jaren blootgesteld aan Phytophthora. In dergelijke situaties ontstaat een soort wapenwedloop. Daarbij ontstaan via evolutie en selectie planten die zich dankzij resistentiegenen kunnen verdedigen tegen de ziekteverwekker. Daarna zorgt de selectiedruk er weer voor dat er van de ziekteverwekker types ontstaan die de resistentie kunnen doorbreken. Waarna de bal weer terugligt bij de planten. Zo overleven planten én ziekteverwekkers gedurende vele duizenden jaren naast elkaar.

Toen de Europese cultuuraardappels in Mexico terecht kwamen, kwamen ze dus automatisch ook in contact met Phytophthora.

Halverwege de 19e eeuw kwamen er aardappels vanuit Noord-Amerika naar Europa. Dit keer namen de scheepslui en handelaren tegelijk met de aardappel wél de ziekteverwekker mee. De ziekte



Verspreiding van de aardappel en Phytophthora

verspreidde zich razend snel door heel Europa en daarna naar de rest van de wereld. De ziekte had dramatische gevolgen. Door het snel rottende blad en door de rottende knollen vielen hele oogsten weg. Dat leidde in Ierland zelfs tot grote hongersnood, gevolgd door een grote emigratiegolf. Alles bij elkaar zorgde de aardappelziekte ervoor dat de Ierse bevolking gehalveerd werd.

### Maatschappelijke kosten

Ook nu nog leidt de ziekte over de hele wereld tot opbrengstverliezen en andere kosten. Voor Nederland wordt geschat dat de jaarlijkse totale kosten die met de ziekte samenhangen, meer dan honderd miljoen euro bedragen. Een zo goed mogelijke schatting van de wereldwijde schade, komt uit op tien miljard euro per jaar (Haverkort et al, 2009). Het grootste deel van deze kosten treft ontwikkelingslanden.



Symptomen van *Phytophthora infestans* op het blad



Symptomen van *Phytophthora infestans* in de knol

In westerse landen is de ziekte verantwoordelijk voor meer dan tien procent van het energiegebruik van de aardappelteelt. In Nederland is meer dan vijftig procent van het gebruik van chemische bestrijdingsmiddelen gericht op het bestrijden van *Phytophthora*. In ontwikkelingslanden kunnen de boeren zich vaak geen chemische gewasbeschermingsmiddelen veroorloven. Zij hebben daarom te maken met enorme oogstverliezen. En dat, terwijl ze wel de volledige hoeveelheid land, arbeid en water moeten inzetten. Waar wel chemische middelen worden toegepast gebeurt dat vaak onoordeelkundig.



Gebruik van fungicide in een ontwikkelingsland

### Plantenveredeling

Het uitbreken van de aardappelziekte, ruim 150 jaar geleden, gaf een impuls aan de aardappelveredeling. Veredelaars ontwikkelden vele rassen met resistentie tegen *Phytophthora*. Daarvoor kruisten ze de cultuuraardappel vaak met de wilde aardappelsoort *Solanum demissum*. Veredelaars probeerden ook resistentiegenen uit andere wilde aardappelsoorten te gebruiken, maar dat was over het algemeen te ingewikkeld en in elk geval een zeer langdurig traject. Bij het kruisen van de cultuuraardappel met wilde aardappels, kwam meestal uiteindelijk slechts één enkel resistentiegen in de rassen terecht. Als zo een ras een aantal jaren (zie aardappelveredeling pagina 13) op grotere schaal geteeld werd, werd de resistentie weer door de ziekte doorbroken. Het ontwikkelen van rassen met meer dan één nieuw resistentiegen was toentertijd praktisch onmogelijk.



### DuRPh gebruikt nieuwe mogelijkheden

Het DuRPh-onderzoek maakt, eigenlijk net als de kruisingsveredeling, alleen gebruik van genen van wilde aardappels die met de cultuuraardappel te kruisen zijn. Maar DuRPh past daarbij actuele kennis en technieken toe die het mogelijk maken op uitgekende wijze verschillende resistentiegenen te combineren.

Met nieuwe DNA-analysetechnieken gaan onderzoekers in wilde aardappels op zoek naar genen waarvan ze verwachten dat ze coderen voor resistentie tegen Phytophthora. Met behulp van de bacterie, *Agrobacterium tumefaciens*, brengen ze één of meer van die genen over in weefselweekplantjes van een aardappelras. Ze ontwikkelen aardappelplanten met alléén genen van wilde aardappels, dus zonder zogenoemde selectiemerkers. Deze manier van genetische modificatie wordt 'cisgene genetische modificatie' genoemd. Door gebruik te maken van deze techniek, houden de rassen hun 'oude' eigenschappen (sommige rassen zoals Bintje en Russet Burbank zijn al meer dan honderd jaar oud) en krijgen ze er één of meer genen van wilde aardappels bij.

De onderzoekers bouwen bij voorkeur in één klap wel drie tot vijf genen in die voor resistentie kunnen zorgen. Ze combineren het liefste ook nog eens genen die naar verwachting voor heel verschillende manieren van resistentie zorgen. Daarom gebruiken ze bij voorkeur genen uit twee of drie wilde aardappelsoorten. Op die manier maken ze het voor Phytophthora extra lastig om door de resistentie heen te breken.

### Strategisch gebruik nieuwe rassen

Om de kans op doorbreken van de resistentie zo klein mogelijk te maken, ontwikkelen de onderzoekers zogenaamde 'resistentie-beheer-strategiën'. Die worden ingebouwd in advies-software voor de telers, de zogenoemde beslissingsondersteunende systemen. De onderzoekers ontwikkelen slimme combinaties van bijvoorbeeld het afwisselend telen van verschillende rassen, het tijdelijk op de markt hebben van rassen met een bepaalde set genen en het alleen in bepaalde regio's telen van rassen voorzien van bepaalde sets genen en het eventueel mengen ervan in een veld.

De kans op het doorbreken van resistenties kan daarnaast ook nog verkleind worden door in de regio's waar veel aardappels geteeld worden, monsters te verzamelen van de eventueel nog aanwezige Phytophthora. Door de genetische samenstelling van de monsters te bepalen, bepalen onderzoekers of ze in moeten grijpen en de manier waarop: handhaven of het inzetten van een andere set resistentiegenen in hetzelfde ras.

### Verspreiding van kennis en plantmateriaal

Voor de waardevolle aardappellijnen die kwekers later maken met DuRPh-technologie en geïsoleerde resistentiegenen zullen ze kwekersrecht aanvragen en een deel van de verdiensten op basis van dit kwekersrecht weer terug laten stromen naar het onderzoek. Op die manier kan wellicht een voortdurende investering blijven bestaan in de ontwikkeling van kennis en plantmateriaal. Voor DuRPh is het van groot belang dat de kennis en het materiaal zo veel mogelijk hun weg vinden over de hele wereld. Daarom zullen ontwikkelingslanden die geen handelsbelang hebben voor de Nederlandse pootgoedhandel 'om niet' van de kennis gebruik mogen maken.



Werken op het laboratorium



# Aanpak en eerste resultaten

Het DuRPh-onderzoek bestaat uit 5 projecten

## A) Kloneren

## B) Transformeren

## C) Selecteren

## D) Resistentiebeheer

## E) Communicatie

9

DuRPh

### A) Kloneren van resistentiegenen

Voor het in handen krijgen van nuttige resistentiegenen, worden resistente planten van een bepaalde wilde aardappelsoort, gekruist met een vatbare plant van dezelfde soort. De resistentie zal 'uitsplitsen': een deel van de nakomelingen is vatbaar en een deel is resistent. Door het DNA van deze planten te onderzoeken, kunnen de onderzoekers het gen vinden en uit de plant isoleren (zie 'kloneren' pagina 15).



Biodiversiteit in aardappel

### B) Transformeren

De gekloneerde resistentiegenen worden met behulp van genetische modificatie bij vatbare rassen ingebouwd, bijvoorbeeld Première, Desirée en Aveka. De onderzoekers bouwen ook combinaties van verschillende genen in, zodat de resistentie 'gestapeld' wordt. Op die manier wordt de kans op het doorbreken van de resistentie aanzienlijk verkleind.

Afhankelijk van het stadium van het onderzoek worden de genen ingebouwd mét of zónder selectiemerker, zoals antibioticum-resistentie (zie onderstaande tabel). De resistente rassen die uit het DuRPh-project komen bevatten geen selectiemerker (zie transformeren pagina 17).

*Genen die tot medio 2010 via transformatie bij aardappelrassen zijn ingebouwd*

#### Genen die mét een selectiemerker zijn ingebouwd

- Rpi-blb1
- Rpi-blb2
- R3a
- Rpi-blb1 + Rpi-blb2
- Rpi-sto1
- Rpi-blb3
- Rpi-sto1 + Rpi-vnt1
- Rpi-sto1 + Rpi-blb3
- Rpi-sto1 + Rpi-blb3 + Rpi-vnt1

#### Genen die zónder selectiemerker zijn ingebouwd

- R3a
- Rpi-sto1 + Rpi-blb3 + R3a

### C) Selecteren

Nadat de genen bij planten zijn ingebouwd, bekijken onderzoekers of de genen actief zijn; of ze tot expressie komen. Daarnaast moeten ze vaststellen of er door de weefselkweek en de genetische modificatie geen ongewenste verstoring van de groei en ontwikkeling is veroorzaakt. Dat onderzoek gebeurt in het laboratorium, de kas en in het veld.

Alleen in het laboratorium kan onderzocht worden of alle ingebouwde resistentiegenen goed actief zijn. Voor alle resistentiegenen van de wilde aardappels die geïsoleerd zijn, hebben onderzoekers het Phytophthora-eiwit in handen dat het gen herkent. Door deze eiwitten los van elkaar op bladmateriaal te brengen, kan precies nagaan worden welke resistentiegenen actief zijn (zie effectoren pagina 18).

Natuurlijk wordt ook onderzocht of de resistentie in het veld goed werkt. Voor dat doel richten onderzoekers proefvelden in met planten mét en zónder resistentiegenen. Begin juli infecteren ze de proefvelden met Phytophthora. Doordat de planten als het te droog is extra beregend worden, is al na één of twee weken met het blote oog schade van de ziekte te zien. De ziekte tast de vatbare planten daarna razendsnel aan. De planten die zichzelf goed kunnen verdedigen zijn daardoor al heel snel herkenbaar.

10

DuRPh



*Veldproef met gewone en genetisch gemodificeerde planten*  
Drie weken na de infectie met *Phytophthora infestans* zijn de resistente planten al duidelijk herkenbaar.



*Waarnemingen op het proefveld*



## D) Resistentiebeheer

De hoeveelheid resistentiegenen is niet onuitputtelijk. De DuRPh-onderzoekers zijn daarom heel zuinig zijn op de resistenties. Ze ontwikkelen strategieën waarmee de resistenties zo lang mogelijk bruikbaar zullen zijn.

Ten eerste ontwikkelen de onderzoekers methodes en technieken waarmee ze de genetische samenstelling van de Phytophthora in het veld actief volgen. Daarbij kijken ze naar mutaties in de Phytophthora-genen die de resistentiegenen van de wilde aardappels herkennen, zogenaamde avirulentie-genen van Phytophthora. De resistente aardappelplanten herkennen de eiwitten (effectoren genoemd) die dankzij deze genen worden aangemaakt. Na herkenning laat het blad een groepje cellen rond de infectie doodgaan waardoor ook de Phytophthora sterft (resistentie gebaseerd op een zogenaamde overgevoeligheidsreactie). Als Phytophthora een mutatie oploopt in een avirulentiegen, kan het zijn dat de Phytophthora een nieuwe effector aanmaakt, die door de resistente planten niet wordt herkend. Met dramatische gevolgen: de planten zullen plotseling ziek kunnen worden. De Phytophthora zal zich ook kunnen vermeerderen, waardoor de ziekte snel om zich heen grijpt. De DuRPh-aanpak moet er voor zorgen dat de kans op een dergelijk scenario zo klein mogelijk wordt. Dat is mogelijk door gebruik van nieuwe DNA-analysetechnieken waardoor Phytophthoramonsters snel te analyseren zijn.

Ten tweede zullen de onderzoekers ieder aardappelras doorontwikkelen tot een 'dynamische ras' met unieke combinaties van resistentiegenen. De dynamiek schuilt in slechts één aspect: de samenstelling van de set resistentiegenen. Voor de rest zijn de eigenschappen precies hetzelfde. Door de set genen af te wisselen in de tijd, of in plaats, verkleinen de onderzoekers de kans op het doorbreken van de resistenties.

Tenslotte kan indien nodig, de aardappelteler een beperkte, aanvullende bestrijding uitvoeren. De resistenties houden zo nog langer hun waarde.

De onderzoekers combineren deze aspecten in zogenoemde beslissingsondersteunende computerprogramma's. Daarmee kunnen aardappeltelers de rassen kiezen waarin ze de minste kans op schade hebben en waarmee ze de kans op het doorbreken van de resistenties minimaliseren.

## E) Communicatie

DuRPh maakt bij de veredeling gebruik van cisgene genetische modificatie, een techniek die nog niet gangbaar is in de Nederlandse maatschappij. Daarom communiceren de onderzoekers actief met de buitenwereld, via lezingen, krantenartikelen en internet en nemen deel aan discussies en debatten. Op die manier kunnen belanghebbenden hun eigen mening vormen over het gebruik van cisgene genetische modificatie voor het verkrijgen van duurzame resistentie tegen Phytophthora. Tevens draagt het DuRPh-team op verschillende niveaus bij aan de ontwikkeling van onderwijsmodules.



*Bezoek proefveld*



*Bezoek laboratorium*

# Internationalisering

12

DuRPh

Het DuRPh-team streeft ernaar dat de kennis uit het onderzoek zo breed mogelijk wordt toegepast en dat plantmateriaal en technieken zo snel en breed mogelijk hun weg vinden naar gebruikers over de hele wereld. In dat licht ondertekenden de algemeen directeuren van het International Potato Center (CIP, Lima, Peru), van International Projects of Cornell University (CU, Ithaca, New York, USA) en de Plant Sciences Group van Wageningen UR in september 2009 een intentieverklaring om samen te werken binnen DuRPh, in eerste instantie in Oost-Afrika. CIP en CU werken al samen in Azië (India, Bangladesh) maar de veredeling op resistentie door middel van genetische modificatie, vindt daar nog plaats met gebruik van een selectiemerker (kanamycine-resistentie) en op basis van één enkel resistentiegen uit *S. bulbocastanum*. CIP en CU zien grote meerwaarde in het samen met Wageningen UR gebruiken van de DuRPh-aanpak.



In september 2009 ondertekenden de directeuren van het Internationaal Aardappelcentrum, Cornell University en de Plant Sciences Group van Wageningen UR een intentieverklaring voor samenwerking in ontwikkelingslanden.

## Perspectieven

Als blijkt dat met de DuRPh-aanpak inderdaad duurzaam resistente rassen ontwikkeld en gebruikt kunnen worden én Europa kiest voor een bijzondere positie voor cisgenese binnen de regelgeving rondom genetisch gemodificeerde gewassen, dan kunnen de veredelingsbedrijven samen met Wageningen UR voor een fractie van het DuRPh-onderzoeksbedrag (10 M euro in 10 jaar) hun eigen bestaande rassen 'upgraden' naar duurzaam resistente rassen. Uitgangspunt is dat de inzet van fungiciden met 80% kan dalen en dat nog slechts 'tactisch' hoeft te worden ingegrepen met bestrijdingsmiddelen, om het doorbreken van resistenties – waar die kans bestaat – tegen te gaan.

Het DuRPh-onderzoek is inmiddels zo ver gevorderd dat ontwikkelingslanden die geïnteresseerd zijn relatief eenvoudig aan kunnen haken om hun eigen lokale rassen te voorzien van sets resistentiegenen. Landen als China en India hebben waarschijnlijk voldoende kennis in huis om zelf te kloneren en te transformeren. Landen in Afrika, waar het kennisniveau gemiddeld lager is, kunnen ervoor kiezen om eigen onderzoekers te laten trainen ten aanzien van de DuRPh-aanpak of het kloneren en transformeren buiten het eigen land uit te laten voeren, bijvoorbeeld bij Wageningen UR.

Als het project in 2015 afloopt, zijn er wereldwijd wellicht een aantal 'rijdende treinen' die het ontwikkelen en toepassen van duurzaam resistente aardappelrassen mogelijk maken.

## Verder lezen

Haverkort, A.J., P.C. Struik, R.G.F. Visser and E. Jacobsen, 2009. Applied Biotechnology to Combat Late Blight in Potato Caused by *Phytophthora Infestans* Potato Research: Volume 52: 249-264.



## Aardappelveredeling

Aardappelrassen kunnen verschillen in allerlei eigenschappen zoals de kleur van de schil en van het vlees van de knol, de kook- en bakkwaliteit, de aanpassing aan het klimaat en de weerstand tegen ziekten en plagen. Een aardappelveredelaar zou vaak het liefst maar één bepaalde eigenschap van een ras willen verbeteren. Bijvoorbeeld een rode in plaats van een witte schil omdat bepaalde landen voorkeur hebben voor roodschillige rassen. Helaas is het niet eenvoudig om één eigenschap los van alle andere eigenschappen aan een bestaand ras via kruising toe te voegen. De aardappel is een heterozygoot gewas, waardoor eigenschappen al na één keer kruisen uit elkaar vallen.

Om toch tot een roodschillig ras te komen kruist de veredelaar aardappels met de gewenste nieuwe eigenschap met andere

rassen die aanvullende gewenste eigenschappen bezitten. Door selectie probeert hij een nieuw roodschillig ras te verkrijgen dat het in het land van voorkeur goed doet. Bij het maken van de kruising verwijdert hij in een vroeg stadium de meeldraden van de bloem van bijvoorbeeld een witschillig ras dat het goed doet in het mediterrane voorjaar. Door het weghalen van de meeldraden kan de bloem zichzelf niet meer bestuiven. Dan neemt de veredelaar met een kwastje wat pollen van de meeldraden van een ras met rode schil en brengt dat stuifmeel op de stempel van de bloem van het witschillige ras. De bloemen verwelken, er vormen zich bessen met in iedere bes tientallen zaden.

Het jaar erop worden duizenden zaden, in de kas uitgezaaid. Later selecteert hij de planten die rode knollen hebben. Alleen daarmee gaat hij dan verder. Het jaar erop

poot hij van honderden verschillende zaailingen rode knollen in het veld. Dat jaar selecteert hij de planten met zo veel mogelijk goede eigenschappen, zoals een goed planttype en goede knolvorm. Van planten die hij na selectie aanhoudt, oogst hij weer de knollen.

Zo krijgt de veredelaar na selectie van iedere overgebleven verdelingslijn (kloon) voldoende knollen voor verder onderzoek. In de jaren erna test de veredelaar van steeds minder verdelingslijnen steeds grotere veldjes. De meeste lijnen vallen af omdat ze bijvoorbeeld bepaalde resistenties missen of niet van het goede kooktype zijn. Een deel van de knollen poot hij ook in andere landen om te toetsen of de verdelingslijnen goed zijn aangepast aan verschillende lokale omstandigheden. Als alles goed gaat, kan de aardappelveredelaar tien jaar na de kruising uiteindelijk één of



Aardappelbloemen



Aardappelbessen

een paar lijnen met de door hem gewenste eigenschappen overhouden. Hij geeft de kloon een naam waaronder het nieuwe ras hopelijk over een paar jaar op de markt kan komen. Maar eerst moet de kloon als ras worden geregistreerd, daarna wordt het ras op landbouwkundige gronden getoetst om vervolgens in de rassenlijst te worden opgenomen. Vanaf dat moment (opname in de rassenlijst) is het nieuwe ras verhandelbaar.

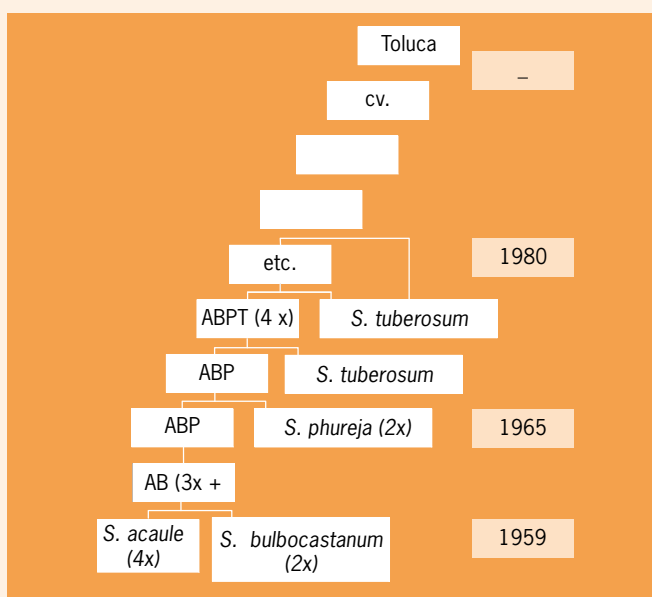
Bovenstaand voorbeeld ging uit van het kruisen van twee bestaande aardappelrassen. Als een veredelaar echter een eigenschap uit een wilde soort moet halen, zoals resistentie tegen *Phytophthora*, dan moet hij bestaande rassen kruisen met die wilde soort. Als de wilde soort niet direct kruisbaar is met het ras, is vaak een extra tussenstap nodig: een extra kruising met een andere wilde soort die wél kruisbaar is met het moderne aardappelras. Zo een tussenstap wordt een brugkruising genoemd.

De nakomeling van dergelijke kruisingen hebben vaak heel veel ongewenste 'wilde' eigenschappen, zoals diepe ogen en een hoog gehalte bitterstoffen. Daarom moet de veredelaar de nakomelingen vele malen terugkruisen met het ras om alle ongewenste 'wilde' eigenschappen te verwijderen. Deze ongewenste eigenschappen worden 'linkage drag' genoemd omdat deze ongewenste genen in het DNA van de wilde aardappel in de directe omgeving van het gewenste gen liggen. De gewenste en ongewenste eigenschappen moeten worden losgekoppeld via extra terugkruisingen. Dat proces kan vele tientallen jaren in beslag nemen. De figuur toont het kruisingsschema van 46 jaar dat nodig was om één enkel resistentiegen uit de wilde soort *Solanum bulbocastanum* (*Rpi-blb2*), over te brengen naar de cultuuraardappel. De aardappelrassen Bionica en Toluca die nu in de biologische aardappelteelt gebruikt worden zijn hiervan een goed voorbeeld.

De tussenstappen die nodig zijn om tot aanvaardbare kruisingsouders voor rassenveredeling te komen, wordt 'pre-breeding' genoemd.

Nieuwe ontwikkelingen in de moderne genetica hebben technieken opgeleverd voor merker gestuurde veredeling. Daarbij kan via een DNA-analyse van een paar gram plantmateriaal voorspeld worden wat de eigenschappen van de volwassen planten zullen zijn. De komende periode komen er voor steeds meer eigenschappen dergelijke selectiemerkers beschikbaar. Deze merkers kunnen het selectieproces versnellen vooral als het gaat om het bij elkaar brengen of houden van verschillende eigenschappen. Deze technologie kan al in een vroeg stadium van de plantontwikkeling toegepast worden. De techniek maakt het helaas niet mogelijk om het probleem van de eerder genoemde 'linkage drag' te omzeilen.

Selectiemerkers zullen ook bij het combineren van resistentiegenen steeds belangrijker worden, vooral als er geen specifieke isolaten van het pathogeen of andere hulpmiddelen beschikbaar zijn, waarmee op de combinatie ('stapeling') geselecteerd kan worden.



Kruisingsschema dat vooraf is gegaan aan het ontwikkelen en op de markt komen van rassen zoals Toluca en Bionica, rassen die anno 2010 in de biologische aardappelteelt worden gebruikt. In totaal heeft het meer dan 45 jaar geduurd om deze rassen met slechts één resistentiegen van de wilde aardappel *Solanum bulbocastanum* (het zogenoemde *Rpi-blb2*-gen) te ontwikkelen ( $x = \text{ploïdie}$ ).



## Kloneren van resistentiegenen

Om te weten te komen of een wilde aardappelsoort een nog onbekend resistentiegen (R-gen) bevat, maken we kruisingen tussen resistente en vatbare planten van soorten die nauw aan elkaar verwant zijn. Daarna worden de nakomelingen getoetst op hun vatbaarheid voor dan wel resistentie tegen Phytophthora. Uit de verhouding tussen vatbare en resistente nakomelingen kunnen we vaststellen of de resistentie inderdaad door

één gen bepaald wordt. Bij een uitsplitsing-verhouding van 1:1 resistentie en vatbaarheid kunnen we concluderen dat er één dominant R-gen verantwoordelijk is voor de resistentie. Met deze resultaten kunnen we op zoek naar het resistentiegen.

Voor het vaststellen van resistentie en vatbaarheid wordt gebruik gemaakt van bladtoetsen in het laboratorium en toetsen op hele planten in het veld. Daarbij

besmetten we de bladeren of planten met sporen van een Phytophthora-isolaat dat goed gekarakteriseerd is. Tegenwoordig gebruiken we naast deze toetsen ook zogenaamde effectortoetsen (zie effectoren pagina 18).

Nadat een nakomelingenpopulatie op deze manier gekarakteriseerd is, moet worden vastgesteld waar in het 'genoom' het nieuwe R-gen zich bevindt. Het genoom is de verzameling van alle genen uit een aardappelplant, verdeeld over de 12 chromosomen. Dit vaststellen van de plaats gebeurt met zogenaamde moleculaire merkers waarvan de positie in het genoom al eerder bepaald is. Dit leidt in eerste instantie tot een ruwe schatting van de plaats van het R-gen (genetische kaart). Vervolgens wordt verder 'ingezoomd', om een nauwkeuriger plaats op de genetische kaart te bepalen. Daarvoor wordt tegenwoordig gebruik gemaakt van de volledige DNA-bouwsteenvolgorde (sequentie) van de cultuuraardappel, die in 2010 beschikbaar is gekomen.

Nadat een nauwkeurige genetische positie is bepaald wordt het DNA van de wilde aardappel in relatief kleine brokjes geknipt. Omdat bekend is welke bekende stukken DNA in de buurt van het gen liggen, kunnen we op zoek naar de brokstukken waar het gen op zou moeten liggen. Om het juiste brokstuk te vinden worden alle stukken DNA eerst in zogenaamde Bacterial Artificial Chromosomes ingebouwd. Dergelijke stukken DNA worden



*Uitsplitsing van resistentie bij nakomelingen van een kruising met *S. bulbocastanum**

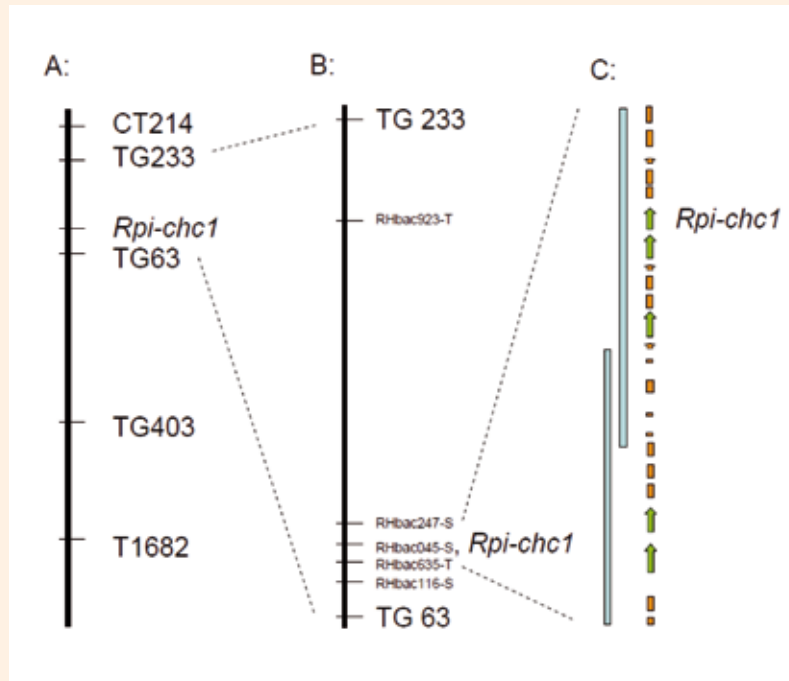
Een resistente plant van *S. bulbocastanum* is gekruist met een vatbare plant. De bladeren van nakomelingen zijn geïnoculeerd met een Phytophthora-isolaat met een zogenaamd avirulentiegen, dat codeert voor een effector die door de resistente planten herkend wordt. Door deze herkenning kunnen de planten een gerichte afweer in gang zetten.

in een bacterie vermeerderd (gekloneerd). In iedere bacteriekolonie wordt dan één stukje planten-DNA meevermeerderd. Daarna gaan we op zoek naar de bacteriekolonies waarin stukken DNA zitten die heel dicht in de buurt van het R-gen liggen. In het schema hieronder onder C, zijn twee bacteriekolonies met aardappel DNA gevonden die samen het hele stuk aardappel chromosoom beslaan waarin het R-gen moet liggen.

Vervolgens wordt van deze twee DNA-broekstukken van de wilde aardappel, de exacte DNA-bouwsteenvolgorde bepaald. Met behulp van bio-informatica technieken wordt dan uitgezocht óf en waar genen gelegen zijn die mogelijk verantwoordelijk zijn voor de resistentie. In het schematische voorbeeld werden ongeveer 20 genen voorspeld.

We weten dan nog niet welk van deze genen het R-gen is. Op basis van het DNA bouwstenen volgorde valt een deel van de twintig genen af. Van de overblijvende 'kandidaat R-genen' wordt daarna onderzocht of ze daadwerkelijk voor resistentie coderen. In het verleden moesten de genen dan via genetische modificatie in aardappel worden gebracht, waarna de planten op resistentie getoetst konden worden. Tegenwoordig kan dit traject versneld uitgevoerd worden doordat ook het DNA van *Phytophthora infestans* volledig in kaart gebracht is. We hebben een serie Phytophthora-genen geïdentificeerd waarvan we verwachten dat ze coderen voor componenten die door R-genen herkend worden (effectoren).

In speciaal geconditioneerde kasruimtes transformeren we tabaksbladeren met genen van wilde aardappels waarvan we verwachten dat het R-genen zijn. We transformeren de bladeren tegelijkertijd ook met mogelijke Avr-genen (zie effectoren) van *Phytophthora*. De cellen van de bladeren gaan dan de genen 'aflezen'. Als er een combinatie van Avr-gen met bijpassend R-gen is gebruikt, reageert het blad met het laten afsterven van cellen. Deze reactie vindt ook in de wilde aardappel plaats, en zorgt ervoor dat *Phytophthora* niet verder kan groeien. We noemen dit een overgevoeligheidsreactie.



Schematisch voorbeeld van het bepalen van de positie van een resistentie-gen: het *Rpi-chc1*-gen. Zie de tekst voor de uitleg



Klonen uit een BAC bank

Van een plant waaruit we een R-gen willen kloneren, knippen we het DNA met een enzym in relatief kleine stukjes. De stukjes aardappel DNA worden gekloneerd in de bacterie *Escherichia coli*. Vervolgens laten we iedere bacterie, met daarin één klein stukje DNA van de wilde aardappel, uitgroeien tot een kolonie. De *E. coli* kolonies die succesvol een stukje van het aardappel DNA hebben opgenomen, zijn eenvoudig te vinden doordat ze wit zijn.



# Transformeren

De Resistentiegenen (R-genen) van wilde aardappels worden met behulp van zogenaamde plasmides, cirkelvormig stukjes DNA die veel bij bacteriën voorkomen, overgebracht naar *Agrobacterium tumefaciens* bacteriën. *Agrobacterium* kan zo de R-genen inbouwen in het DNA van de cultuur-aardappel. Stukjes stengel van cultuuraardappels worden gedurende enkele uren in een suspensie van *Agrobacterium* met de R-genen gebracht. De *Agrobacterium* krijgt de kans om bij cellen van het stengelstukje binnen te komen en het DNA daar in te bouwen. Na 2 tot 3 dagen is het DNA van de wilde aardappels in het DNA van de cultuuraardappel overgebracht. Van de stengelstukjes is nu een deel van de cellen genetisch gemodificeerd. De stengelstukjes worden daarna op een voedingsmedium gezet, zodat uit de

stengelstukjes nieuwe plantjes kunnen uitgroeien. Bij de plantjes die ontstaan zijn uit een cel waarbij het DNA van de wilde aardappels is ingebouwd, ongeveer drie procent van de nieuwe plantjes, bevatten alle cellen het extra DNA van de wilde aardappels. Alle nieuwe plantjes worden daarom ook op het laboratorium onderzocht, zodat de plantjes uitgezocht kunnen worden die daadwerkelijk het DNA van de wilde aardappels bevatten. Deze plantjes worden de 'transformanten' genoemd.

Hierna kunnen de transformanten getoetst worden op resistentie tegen *Phytophthora*. Daarnaast wordt het DNA van de transformanten meer in detail onderzocht. Op die manier worden de planten geselecteerd waarbij de *Agrobacterium* alléén het DNA van de wilde aardappels heeft ingebouwd.

## NORMALE VEREDELING



## GENETISCHE MODIFICATIE



Schematische voorstelling van traditionele veredeling en veredeling met behulp van gentechnologie

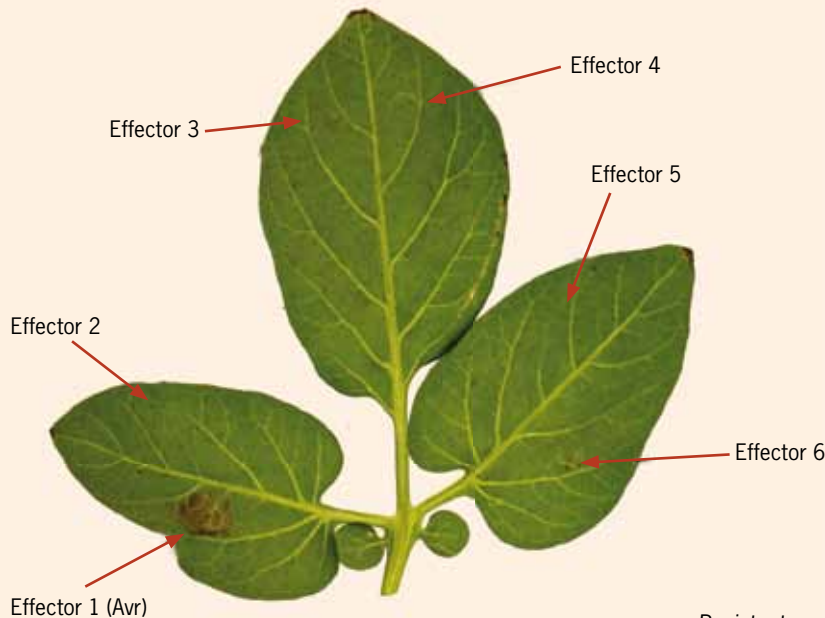
## Effectoren: belangrijke schakel

Tijdens het infectieproces vormt de oömyceet *Phytophthora infestans* kleine infectie-structuurtjes (haustoria) in de bladcellen van de aardappelplant. *Phytophthora* scheidt daar specifieke effectoren af, stoffen die vervolgens in de bladcel opgenomen worden. Sommige aardappelrassen kunnen die effectoren herkennen met behulp van het eiwit dat gecodeerd wordt door het bijbehorende resistentie (R) gen. In dat geval noemen we het *Phytophthora*-gen dat voor het effector-eiwit codeert een avirulentie-gen (Avr). Na de herkenning treedt een overgevoeligheidsreactie op, waarbij een groepje bladcellen rondom de infectie afsterft en daarmee ook de ziekteverwekker. Daaruit blijkt dat dit aardappelras resistent is tegen deze *Phytophthora* stam.

De Avr-eiwitten van *Phytophthora* hebben een bepaald 'motief' (het zogenoemde RXLR motief, een deel van het eiwit met een kenmerkende structuur en functie) waarmee ze de plantencel kunnen binnendringen. In het DNA van *Phytophthora infestans* zijn meer dan 500 plaatsen gevonden die coderen voor RXLR effector eiwitten. Een groot deel van deze eiwitten worden aangemaakt tijdens het infectieproces. Dat zijn in potentie Avr-effector eiwitten: eiwitten die *Phytophthora* kan herkennen dankzij R-genen. De DNA-code voor deze RXLR effectoren hebben we afzonderlijk in de bacterie *Agrobacterium tumefaciens* overgebracht. De *Agrobacterium* cultures met genen voor RXLR-effectoren infiltreren we samen met *Agrobacterium* cultures met R-genen uit wilde aardappels in een blad

van een tabaksplant. Waar in het blad een overgevoeligheidsreactie ontstaat, is er herkenning tussen het R-eiwit en de effector opgetreden. Het eiwit is dan als Avr-eiwit geïdentificeerd. *Phytophthora* stammen die dit Avr-eiwit produceren kunnen aardappelrassen met dit specifieke R-gen dan niet aantasten.

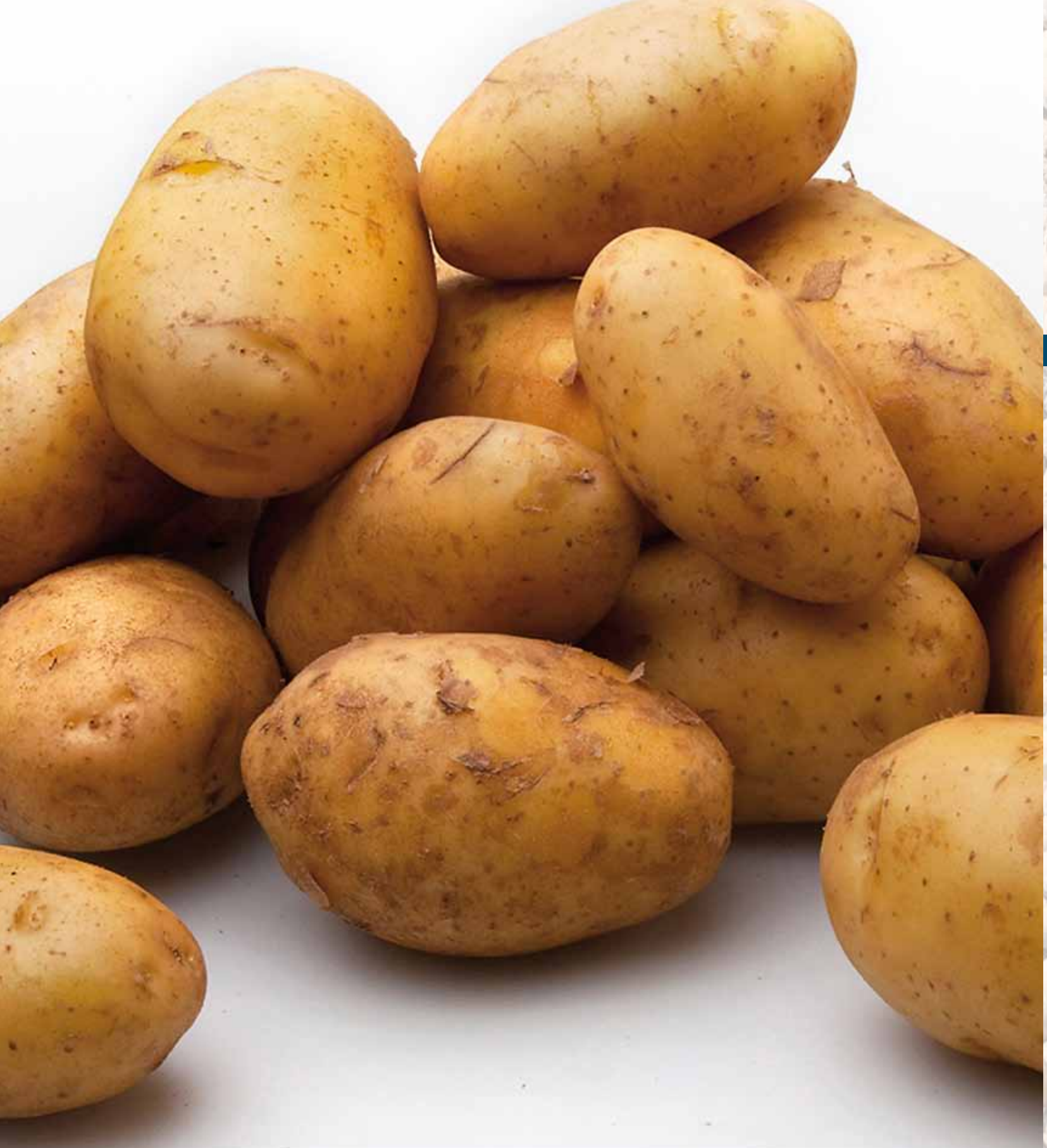
De infiltratietechniek met Avr-genen kunnen we ook toepassen om te onderzoeken of R-genen biologisch actief zijn, bijvoorbeeld in genetisch gemodificeerde aardappels waar een combinatie van drie R-genen van wilde aardappels ingebracht is (zogenaamde gestapelde R-genen). We infiltreren dan *Agrobacterium* cultures met de bijbehorende Avr-genen apart in het blad van de genetisch gemodificeerde aardappel, en beoordelen waar een overgevoeligheidsreactie optreedt. Als de drie Avr-genen een overgevoeligheidsreactie veroorzaken, kunnen we concluderen dat de drie bijbehorende R-genen werkzaam zijn, en de plant dus een drievoudige bescherming bieden. Een voordeel van deze onderzoekstechniek is dat de methode ook kwantitatief is: hoe minder Avr-eiwit nodig is om de overgevoeligheidsreactie te induceren, hoe hoger het resistentieniveau dat het bijbehorende R-gen geeft aan de aardappel. Dat levert dus informatie over de kwaliteit van de cisgene aardappel.



Resistente aardappel herkent het Avr-eiwit.

De overgevoeligheidsreactie is zichtbaar als een donkerbruine vlek.





## **DuRPh - Duurzame resistentie tegen Phytophthora in aardappel door cisgene merkervrije modificatie**

Wageningen UR voert in opdracht van het Ministerie van LNV het tienjarige DuRPh-project uit: fundamenteel en toegepast onderzoek voor het ontwikkelen van een prototype van een aardappelras dat in hoge mate en gedurende vele jaren resistent is tegen Phytophthora, de belangrijkste aardappelziekte. DuRPh zal daarmee de duurzaamheid van de aardappelteelt en van de pootgoedteelt aanzienlijk verhogen. Het Fonds Economische Structuurversterking (FES) financiert DuRPh. DuRPh is nu halverwege. Deze brochure levert informatie over de doelen, inhoud en voortgang van het onderzoek.

# DuRPh halverwege

DuRPh is een belangrijk onderdeel van de Wageningen UR-brede aanpak voor de ontwikkeling van duurzame oplossingen voor het wereldwijde Phytophthora-probleem. Daarbij worden tegelijkertijd verschillende onderzoeklijnen gevolgd.

In het veredelingsonderzoek wordt gekeken naar nieuwe mogelijkheden om via kruisingsveredeling rassen met duurzame resistentie te ontwikkelen, zoals binnen het Bio-impuls programma, én naar mogelijkheden om dit via cisgenese te doen, zoals binnen DuRPh. Deze beide onderzoeklijnen maken gebruik van de meest actuele kennis over resistentiegenen van wilde aardappels die binnen Wageningen UR en elders ontwikkeld wordt en van de kennis van de ziekteverwekker.

Onderzoekers van Wageningen UR wisselen resultaten van de verschillende onderzoeklijnen met elkaar uit, zodat hun onderzoek op een optimale wijze tot duurzame oplossingen zal leiden.

### **Programmacoördinator**

Anton Haverkort (Plant Research International)

### **Wageningen UR stuurgroep**

Piet Boonekamp (Plant Research International)

Evert Jacobsen (Wageningen University)

Richard Visser (Wageningen University)

### **Projectgroep**

Jack Vossen (klonering, transformatie)

Ronald Hutten (selectie)

Geert Kessel (resistentiemanagement)

Bert Lotz (communicatie)

### **Contactpersonen Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit**

Jaap Satter en Marien Valstar (Directie Agroketens en Visserij)

Bart van den Assum (Directie Voedsel, Dier en Consument)