

Resistente aardappelrassen als onderdeel van een aaltjes beheersingsstrategie

R. Janssen

Plant Research International, Business Unit Biodiversiteit en Veredeling
Email: Richard.Janssen@wur.nl

Omdat populaties van wortelknobbelaaltjes zich gedurende de teelt van aardappel van zeer lage niveau's tot schadelijke dichtheden kunnen vermeerderen is resistentie binnen dit gevoelige gewas dringend gewenst. Resistente voorvruchten zijn hier niet afdoende. Wereldwijd zijn er slechts enkele resistenties tegen *Meloidogyne* spp geïdentificeerd en nog minder uiteindelijk geïntroduceerd in cultuurgewassen. In de aardappelcollectie van Plant Research International zijn echter in diverse wilde *Solanum* soorten hoge resistentieniveau's aangetroffen. Van *S. fendleri*, *S. bulbocastanum* en *S. hougasii* is vastgesteld dat de resistentie monogeen overerft. De aardappelkweekbedrijven hebben vooral belangstelling getoond voor *S. fendleri*.

Het resistentieonderzoek op Plant Research International richt zich op het identificeren en isoleren van resistentiegenen, gebruikmakend van standaard AFLP procedures tot innovatieve genisolatie-technieken. Een belangrijk onderdeel van dit onderzoeksprogramma is de ontwikkeling van moleculaire selectiemerkers voor veredelingsbedrijven.

Geschiedenis resistentieveredeling in aardappel tegen nematoden

In het begin van de jaren vijftig werd op het toenmalige SVP

(Stichting voor Plantenveredeling) een uitvoerig veredelingsprogramma gestart om resistentie tegen aardappelcysteaaltjes, *Globodera rostochiensis* en *G. pallida*, in te kruisen in aardappelrassen. Aanleiding was het uitbreken van aardappelmoehed in de Veenkoloniën. Alle beschikbare rassen waren toen vatbaar. Vooral het werk van Huijsman en Vinke heeft geresulteerd in een bron van waardevolle geniteurs met goede agronomische eigenschappen, waaruit de veredelingsbedrijven een groot aantal rassen heeft voortgebracht met resistentie tegen zowel *Globodera rostochiensis* als *G. pallida*. Enkele beroemde nummers uit het SVP veredelingsprogramma waren *Solanum tuberosum* ssp *andigenum* CPC 1673, (VTn)2 62-33-3 en AM 78-3778. Na de geslaagde introductie van de geïntegreerde bestrijding van aardappelcysteaaltjes, bestaande uit vruchtwisseling, resistente rassen en grondontsmetting nam het probleem in de fabrieksaardappelteelt geleidelijk af en daarmee de hieraan gerelateerde AM-onderzoeksprogramma's.

Met het terugdringen van het gebruik van grondontsmettingsmiddelen eind jaren tachtig dienden zich nieuwe aaltjes problemen aan voor de aardappelteelt. De belangrijkste zijn de wortelknobbelaaltjes, *Meloidogyne hapla*, *M. chitwoodi* en *M. fallax*. In het huidige rassenpakket bevinden zich geen resistente rassen voor deze wortel-

knobbelaaltjes soorten. Vanwege het polyfage en persistente karakter van deze aaltjes is schade niet of nauwelijks te voorkomen met behulp van vruchtwisselingsmaatregelen. Voor een milieuvriendelijke schadebeheersing wordt wederom een aanpak nagestreefd van een geïntegreerd pakket maatregelen, vooralsnog zonder gebruik van resistente aardappelrassen. Het veredelingsprogramma op resistentie tegen wortelknobbelaaltjes in aardappel is in 1992 gestart op het toenmalige CPRO-DLO en heeft geresulteerd in een aantal geniteurs, die inmiddels op veredelingsbedrijven worden gebruikt.

Duurzaamheid

Een duurzame methode om kwaliteitsschade en besmetting van *Meloidogyne*-vrije percelen via geïnfecteerde knollen te voorkomen is het gebruik van resistente aardappelrassen. Dat resistentieveredeling tegen wortelknobbelaaltjes perspectief biedt, kan worden geïllustreerd met het succesverhaal van het Mi-resistentiegen tegen *M. incognita* in tomaat, afkomstig uit de wilde verwant *Lycopersicon peruvianum*. Het desbetreffende resistentiegen, dat al begin jaren veertig werd ontdekt, heeft geresulteerd in de introductie van een groot aantal resistente tomatenrassen. De duurzaamheid van deze rassen valt te vergelijken met de in Engeland geteelde aardappel-

ARTIKEL

rassen met het H1-resistentiegen uit *S. tuberosum* ssp. *andigenum* CPC1673 tegen het Ro1-pathotype van het aardappelcysteeltje. In tegenstelling tot de Nederlandse situatie zijn voor deze rassen nog steeds geen virulente populaties van *G. rostochiensis* gevonden.

Toetsmethoden

Het huidige resistentieonderzoek tegen wortelknobbelaaltjes kenmerkt zich door het gebruik van soort-zuivere populaties. Veldpopulaties van wortelknobbelaaltjes zijn in veel gevallen mengels van soorten. Onderzoek met dergelijke populaties bemoeilijkt het opsporen van resistentiebronnen tegen een bepaalde soort. Voor het verkrijgen van soort-zuivere populaties worden eiproppen gebruikt, waarvan de vrouwtjes individueel op soort zijn geïdentificeerd. *Solanum* materiaal van werkcollecties en genenbanken uit binnen- en buitenland zijn met deze soort-zuivere populaties van *M. chitwoodi*, *M. fallax* en *M. hapla* getoetst op resistentie.

Voor het ontwikkelen van een toetsmethode is een groot aantal materialen geëvalueerd onder verschillende groeiomstandigheden, die de efficiëntie van het screenen kunnen beïnvloeden. Het screenen van wortelstelsels van knollen kan uitgevoerd worden in stenen potten, transparante plastic bekken, petrischalen en 'seed growth pouches', terwijl voor het screenen van zaailingen en stekken naast stenen potjes, vierkante plastic ko-

kertjes worden gebruikt. Het gebruik van 'seed growth pouches', een plastic zakje met filtreerpapier, en petrischalen lenen zich bij uitstek voor accessies, waarvan weinig materiaal aanwezig is. Deze manier van toetsen, waarbij een stukje aardappel met spruit te wortelen worden gelegd, biedt de mogelijkheid om de infectie in de tijd te volgen. Methoden die ook uitermate geschikt zijn voor historische studies ter bestudering van het resistentiemechanisme. De mate van resistentie wordt bepaald aan de hand van het aantal eiproppen op het wortelstelsel. Het bepalen van de eiproppen kan snel en nauwkeurig geschieden na kleuring met Phloxine-B.

Screening en interactieonderzoek

In het wilde *Solanum*-materiaal afkomstig uit Zuid-Amerika, zoals *S. bulbocastanum*, *S. fendleri*, *S. stoloniferum* en *S. hougasii* werd resistentie gevonden tegen zowel *M. chitwoodi* als *M. fallax*. Voor *M. hapla* werd onder andere resistentie gevonden in *S. chacoense* en *S. sparsipilum* (zie tabel 1). In het algemeen kan worden gesteld dat resistentie tegen *M. chitwoodi* en *M. fallax* alleen in de *Solanum* soorten uit Midden Amerika voorkomt. Resistentie tegen *M. hapla* treft men meer aan in soorten die zowel in Midden-, als in Zuid Amerika voorkomen.

Van de geselecteerde *Solanum* soorten werd de werkingsbreedte en het niveau van resistentie be-

paald door ze op een groot aantal isolaten van *M. chitwoodi*, *M. fallax* en *M. hapla* te toetsen. Tevens werd een aantal soorten getoetst tegen populaties van de warmteminnende wortelknobbelaaltjes soorten, *M. incognita*, *M. arenaria* en *M. javanica*. Geen van de *Solanum*-soorten met resistentie voor *M. chitwoodi*, *M. fallax* en *M. hapla* bleek resistent te zijn voor deze tropische wortelknobbelaaltjes.

Mocht blijken dat ook voor wortelknobbelaaltjes een gen-om-gen systeem bestaat, zoals bij het aardappelcysteeltje, *Globodera rostochiensis*, dan is het gericht afwischen of combineren van R-genen een uitermate efficiënt instrument voor resistentiemanagement in een aaltjesbeheersingsstrategie. Het bestaan van pathotypen van *M. chitwoodi* voor resistenties binnen *S. bulbocastanum* is inmiddels vastgesteld (tabel 2). Het meest virulente pathotype is in Nederland nog zeldzaam. Voor het aantonen van een gen-om-gen systeem wordt de interactie tussen de resistentiegenen in *S. bulbocastanum*-geniteurs en de virulentiegenen in representatieve isolaten van vier 'bulbocastrum' pathotypen van *M. chitwoodi* nader bestudeerd.

Resistentieverdeling tegen wortelknobbelaaltjes

Een belangrijk aspect bij resistentieverdeling is de genetische aard van de resistentie. Bij introgressie

Tabel 1. Overzicht van het resistentiepatroon en de wijze van overerving van wilde *Solanum* soorten voor *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* en *M. hapla*.

<i>Solanum</i> sp.	Accessie nummer	2n	<i>M. chitwoodi</i>	<i>M. fallax</i>	<i>M. hapla</i>	overerving
<i>bulbocastanum</i>	93-60-2	24	ja	ja	enige	monogeen
<i>hougasii</i>	93-71-6	72	ja	ja	enige	monogeen
<i>fendleri</i>	93-114-12	48	'ja'	ja	nee	monogeen
<i>stoloniferum</i>	93-stol-3	48	'ja'	ja	nee	oligogeen
<i>chacoense</i>	93-113-1	24	nee	ja?	ja	oligogeen

Tabel 2. Pathotypering van *M. chitwoodi* isolaten ten opzichte van resistenties in *Solanum bulbocastanum*. (V=vatbaar, R=Resistent)

S. bulbocastanum geniteurs	M. chitwoodi-isolaten			
	Cat	Cbd-V5	Cbd-V1	Cbd-V3
SB-4	V	V	V	V
93-57-5	R	V	V	V
93-60-2	R	R	V	V
SB-22	R	R	R	V

van resistentie naar de cultuur-aardappel gaat de voorkeur uit naar monogeen overervende R-geenen. Voor het bestuderen van de overerving van de resistentie in de *Solanum* soorten met resistentie zijn diverse kruisingen gemaakt. Een probleem bij deze kruisingen is vaak dat de soort niet kruisbaar is met de cultuur-aardappel. Om dit te ondervangen worden intraspecifieke kruisingen uitgevoerd. Dat zijn kruisingen tussen geniteurs binnen de soort. Voor de intraspecifieke kruising tussen een resistente en een vatbare geniteur van *S. bulbocastanum* (diploid, 2x) wezen de uitsplitsingen in resistente en vatbare planten in de nakomelingschap duidelijk op een monogeen dominant overervend resistentie-gen, Rmc1. Na de bestudering van de F1 voor *S. fendleri* bleek het resistentie-gen, Rmc2, in de tetraploide *S. fendleri* (4x) ouder in de simplex vorm aanwezig te zijn.

Voor het ondervangen van de kruisbaarheid van de wilde *Solanum* soorten met de cultuur-aardappel kan in sommige situaties gebruik gemaakt worden van protoplastenfusies of in vitro cultuur van onvolgroeide zaden. Dit is echter zeer tijdrovend en arbeidsintensief. Vooral nog zijn er voldoende waardevolle soorten zonder kruisingsbarrières waarmee introgressie van resistentie naar de gecultiveerde aardappel met behulp van interspecifieke kruisingen kan worden uitgevoerd. Naast het reeds lopende onderzoek met *S. bulbocastanum* en *S. fendleri*, zijn er veredelingsprogramma's met *S. stoloniferum* en *S. hougasii* in uitvoering.

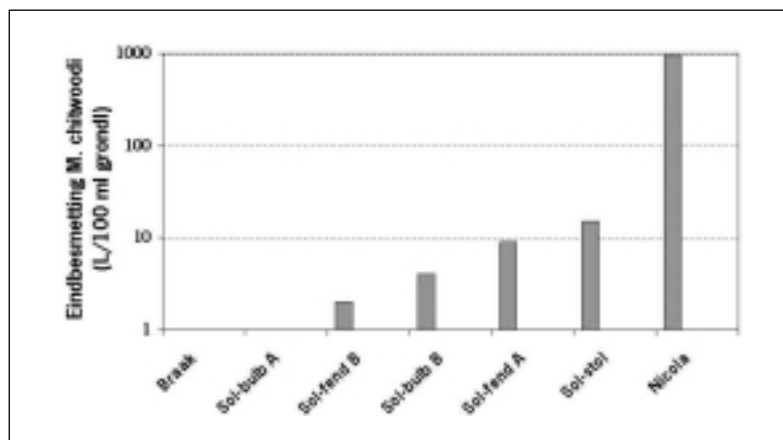
Veldproeven

Geniteurs van *S. fendleri*, *S. stoloniferum* en *S. bulbocastanum* zijn in veldproeven door PPO-AGV, Lelystad getoetst. De planten werden in geïsoleerde microplots op natuurlijke wijze geïnfecteerd, waarbij het infectieniveau in de grond voor en na de teelt werd bepaald. Ten opzichte van het vatbare ras Nicola was de zeer beperkte vermeerdering van de wortelknobbelaaltjes op deze geniteurs opmerkelijk. Het gaat hier om een factor 100 – 1000 in vergelijking met cv Nicola (zie figuur 1). Daarmee werd tevens de reproduceerbaarheid en betrouwbaarheid van de kastoetsingen bevestigd, een zeer belangrijk facet in een veredelingsprogramma.

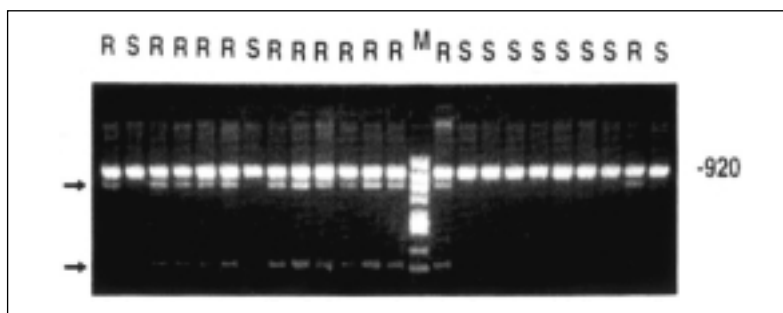
Moleculaire merkers

Met de ontwikkeling van moleculaire merkers door de moleculaire biologie is het mogelijk geworden om snel, eenvoudig en routinematig grote kruisingspopulaties op een gewenste eigenschap te screenen. Indirecte selectie met merkers, die nauw gekoppeld zijn aan een bepaalde eigenschap, heeft als voordeel dat de selectie onafhankelijk is van plantleeftijd, ontwikkelingsstadium en weefseltype, vanwege het feit dat analyse plaatsvindt met DNA. Zo kan de toetsing op nematoderesistentie na DNA isolatie uit het blad al in het zaailingstadium plaatsvinden. Een ander belangrijk voordeel van moleculaire merkers is dat milieuomstandigheden er geen invloed op hebben. Zo is de expressie van het Mi-resistentiegen tegen *M. incognita* temperatuur afhankelijk. Een bijkomend praktisch voordeel van het gebruik van merkers is dat de selectie op verschillende eigenschappen tegelijk in één bepaling kan worden uitgevoerd.

Voor het Rmc2 resistentiegen uit *S. fendleri* zijn op basis van AFLP merkers (Amplified Fragment Length Polymorphism) selectiemerkers ontwikkeld, die nauw gekoppeld zijn met dit resistentiegen. Deze CAPS merkers (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) liggen zo drie tot twee cM van het Rmc2 resistentiegen (zie figuur 2). Voor een optimale indirecte selectie is het wenselijk om merkers te hebben die binnen een cM van het gen aflaggen, of liever nog, er bovenop liggen. Voor dat laatste wordt er een beroep gedaan op een BAC-bank (Bacteria Artificial



Figuur 1. Veldomstandigheden (juiste fruncatie of geen).



Figuur 2. Profiel van een CAPS-merker voor een *S. bulbocastanum* geniteur. De banden laten een uitsplitsing zien in vatbare (S) en resistente (R) planten.

Chromosomes) van *S. fendleri*.

Een BAC-bank is een collectie bacterie-klonen van *E. coli* waarin het DNA van *S. fendleri* in fragmenten aanwezig is. Met behulp van CAPS merkers kan de BAC bank gescreend worden om BACs te isoleren die de betreffende merker be-

vatten. Deze BACs zullen worden gebruikt om een BAC-contig te maken, waarop het te kloneren resistentiegen zich bevindt, met als doel het isoleren van het resistentiegen. Sequentie informatie van het resistentiegen zal uiteindelijk resulteren in de ontwikkeling van

merkers die direct gekoppeld zijn aan dit gen.

Met de instrumenten die de moleculaire biologie de veredeling biedt, zal er ingezet moeten worden op de ontwikkeling van aardappelrassen met verschillende R genen, die effectief zijn tegen de meest voorkomende virulenties binnen de wortelknobbelaaltjes soorten. Met een slim rotatiesysteem van deze rassen in een geïntegreerd aaltjesbeheersingssysteem moet het mogelijk zijn een reductie van schade door dit plantparasitaire aaltje in de aardappelteelt te bewerkstelligen. Het zal echter nog enige jaren duren voordat de veredelingsbedrijven met hun praktijkrassen op de markt komen.