

Duurzame resistentie tegen *Phytophthora*: DuRPh, een update

Anton Haverkort, Piet Boonekamp, Evert Jacobsen, Paul Struik en Richard Visser

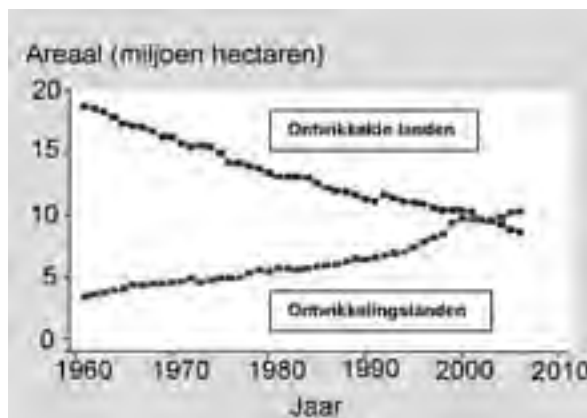
Wageningen UR

Inleiding

In 2006 startte Wageningen UR het tienjarige project DuRPh (Duurzame Resistentie tegen *Phytophthora*). In dit project worden bestaande aardappelrassen door middel van cisgenese en stapeling van *R*-genen resistent gemaakt tegen de aardappelziekte. Deze bijdrage wil de lezer op de hoogte brengen van de noodzaak van beschikbaarheid van resistente aardappelrassen hier en in ontwikkelingslanden, de vorderingen en aandachtspunten rond deze inspanning.

De aardappel wordt tegenwoordig in bijna alle landen van de wereld geteeld. Uitzonderingen zijn slechts die gebieden waar het jaarrond te warm of te koud is. In 2005 was het areaal ruim 20 miljoen hectare met een totale productie van ruim 320 miljoen ton. Na tarwe (630 Mt) en rijst (608 Mt) is het in omvang van de verse productie het derde gewas voor menselijke consumptie. Er wordt wereldwijd wel meer maïs geteeld (725 Mt) maar veel daarvan dient als veevoer en sinds kort ook voor bioethanolproductie. Gedurende de laatste veertig jaar veranderde het aardappelareaal mondiaal nauwelijks doordat de daling van het areaal in de ontwikkelde landen (vooral in Oost-Europa) werd gecompenseerd door een verdrievoudiging van het areaal in ontwikkelingslanden. Hierdoor is het aardappelareaal nu groter in ontwikkelingslanden dan in ontwikkelde landen, een trend die zich ook in de komende jaren zal doorzetten (figuur 1).

De afname in de ontwikkelde landen, met name in Oost-Europa, komt doordat aardappel niet langer als diervoer wordt gebruikt, en omdat het (lagere) menselijke aardappelconsumptiepatroon van West-Europa overgenomen is. De oorzaken voor de snelle toename in ontwikkelingslanden zijn de prominente plek die de aardappel inneemt in de veranderende consumptiepatronen, de hoge efficiëntie waarmee het aardappelgewas hulpbronnen benut, de



Figuur 1. Trends in aardappelarealen sinds 1960 (bron: FAOStat).

technologische ontwikkelingen in pootgoed en chemische industrie en de ecologische niche die de winterteelt van aardappel in Azië heeft gevonden tussen twee rijstteelten in.

De maatschappelijke kosten van *Phytophthora infestans*

Meer dan 400 jaar geleden is de aardappel door de Spanjaarden naar Europa gebracht en deze heeft langzamerhand in bepaalde streken granen als belangrijkste voedsel verdrongen. De aardappelziekte, veroorzaakt door de oömyceet *Phytophthora infestans*, kwam niet meteen mee. Mogelijk kwam dat doordat de ziekte in het oorsprongsgebied in Peru toen nog niet voorkwam. Misschien was de oorzaak dat eventueel aangetaste knollen onderweg verrotten, of omdat de introductie van de aardappel in Europa middels zaad plaats vond. Verspreiding van de teelt in Noord-Amerika bracht het gewas in contact met de ziekte vanuit Mexico. Halverwege de 19^e eeuw vond herintroductie plaats, maar nu uit Noord-Amerika. Tegelijk met de aardappel kwam nu de ziekte wél mee en verspreidde zich razendsnel over Europa en van daaruit naar de rest van de wereld. De jaarlijkse

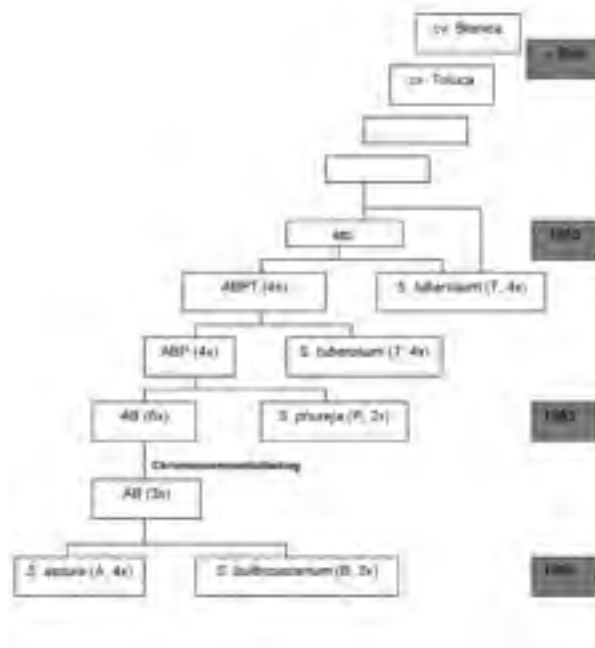
ARTIKEL

schade en kosten samenhangend met de ziekte belopen in Nederland meer dan € 100 miljoen. Extrapolatie van deze schade en kosten naar de rest van de wereld resulteert in een bedrag van meer dan € 10 miljard per jaar. Het merendeel van deze maatschappelijke kosten treft ontwikkelingslanden. In westerse landen is de ziekte verantwoordelijk voor meer dan 10% van het energiegebruik van de teelt en in Nederland voor meer dan 50% van de chemische middelen gebruikt in de landbouw. In ontwikkelingslanden daalt door de ziekte vaak de benutting van land en water met meer dan de helft.

In september 2009 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 een intentieverklaring om samen te werken binnen DuRPh, in eerste instantie in Oost-Afrika. CIP en CU werken al samen in Azië maar de resistentieveredeling door middel van genetische modificatie vindt daar plaats met een selectiemerker (kanamycine) en op basis van één enkel *R*-gen uit *S. bulbocastanum*, wat duidelijk zijn beperkingen heeft. CIP en CU zien dan ook grote meerwaarde in het samen met WUR hanteren van de DuRPh-principes. Omdat de geschiedenis geleerd heeft dat resistenties die gebaseerd zijn op enkele genen zeker doorbroken worden, vinden we binnen DuRPh dat er naar gestreefd moet worden om ook in ontwikkelingslanden het concept van dynamische rassen te introduceren gekoppeld aan cisgenese, op eenzelfde wijze als we dit nastreven in Europa.

De principes van DuRPh

Het uitbreken van de aardappelziekte ruim 150 jaar geleden gaf een impuls aan de aardappelveredeling. Er werd voornamelijk steeds een enkel gen uit *S. demissum* ingekruist om een nieuw resistent ras te maken, maar als dat een aantal jaren op wat grotere schaal werd geteeld werd de resistentie steeds doorbroken door inwaaien van een compatibel pathotype of door mutatie van de ziekteverwekker. Inkruisen van andere *R*-genen is mogelijk maar met alle noodzakelijke brugkruisingen is dat een langdurig proces zoals de creatie van de rassen Toluca en Biogold (ontwikkelingstijd 46 jaar, figuur 2) laat zien. Let wel, het stapelen van meerdere *R*-genen is nog ingewikkelder en langzamer. Samen met de maatschappelijke kosten van de aardappelziekte was dit een belangrijke reden voor de overheid om DuRPh te financieren.



Figuur 2. Schema van de interspecifieke brugkruisingsactiviteiten met *Phytophthora*-resistente *S. bulbocastanum* bij Wageningen UR en veredelingsbedrijven leidend tot twee rassen met het breed-spectrum-resistentiegen *Rpi-blb2*.

DuRPh hanteert de volgende principes:

1. Het gaat om genetische modificatie waarbij we *R*-genen uit wilde soorten kloneren en die met *A. tumefaciens* overbrengen naar bestaande rassen.
2. DuRPh gebruikt alleen genen uit soorten die met *S. tuberosum* kruisbaar zijn en gebruikt ook geen selectiemerker zoals kanamycine: dus een cisgene benadering met als product een ras met alleen aardappeleigen genen.
3. De oude- sommige rassen zoals Bintje en Russet Burbank zijn al meer dan 100 jaar oud – raseigenschappen blijven behouden wat heel wenselijk is, omdat vervanging niet eenvoudig is. Daartoe selecteren we uit de geregenereerde plantjes alleen de resistente planten die identiek zijn aan de uitgangsrassen (zogenaamd 'true to type').
4. Om het in het verleden snel optredende doorbreken van resistentie te voorkomen, stapelen we een aantal (drie tot vijf) *R*-genen van verschillende soorten die tot verschillende genclusters behoren.
5. Om de kans op resistentieverlies verder te verminderen zetten we een resistentiebeheer-strategie op waarin *R*-genen in plaats en tijd strategisch worden ingezet. Sets van genen kunnen soms (tijdelijk) worden teruggetrokken en later opnieuw en in nieuwe

combinaties ingezet worden al naar gelang het virulentiespectrum van de heersende *Phytophthora*-populatie.

6. Het continu monitoren van de *Phytophthora*-populatie op mogelijke veranderingen in het virulentiespectrum en adequate bestrijding van *Phytophthora* als dit optreedt, is onderdeel van een te ontwikkelen *Decision Support System* (DSS) om duurzaamheid van de resistenties te behouden.
7. We communiceren zoveel mogelijk over de noodzaak, aanpak en resultaten zodat belanghebbenden hun eigen mening over deze vorm van genetische modificatie kunnen vormen.
8. Het uitbaten van het intellectueel eigendom van patenten zal plaatsvinden via het kwekersrecht waarbij een deel naar WUR zal worden geleid om ook in de toekomst detectie en kloneren van nieuwe *R*-genen mogelijk te maken.

Aanpak en eerste resultaten

Uit aardgasbaten is € 10 miljoen vrijgemaakt voor een periode van 10 jaar (2006-2015) om een programma uit te voeren met de volgende vijf projecten:

a) Kloneren van resistentiegenen

Na kruising van een resistente plant van een wilde soort met een vatbare plant van dezelfde soort worden nakomelingen uit zaad verkregen. Als deze zich uitsplitsen in vatbare en resistente zaailingen concluderen we dat een *R*-gen zich uitsplitst, waarna deze gekloneerd kan worden. Figuur 3 toont de tot nu toe gekloneerde kandidaatgenen.

Kloneren van genen (Map-based)	
Soort	Resistentiegenen
<i>Solanum demissum</i>	<i>R1, R2, R3a, R3b</i>
<i>Solanum bulbocastanum</i>	<i>Rpi-blb1, Rpi-blb2, Rpi-blb3</i>
<i>Solanum venturii</i>	<i>Rpi-vnt1</i>
<i>Solanum papita</i>	<i>Rpi-pta1</i>
<i>Solanum stoloniferum</i>	<i>Rpi-sto1</i>
<i>Solanum ?</i>	<i>Rpi-abpt, R2-achtig</i>

Figuur 3. Resistentiegenen die nu al gekloneerd zijn uit genoemde wilde soorten.

b) Transformeren

Hier worden gekloneerde *R*-genen – al dan niet gestapeld en alléén voor het onderzoek van een selectiemerker voorzien – met de vector *A. tumefaciens* overgebracht naar bestaande rassen (Première, Désirée en Aveka). Na regeneratie wordt getest of alle resistentiegenen ook individueel een resistentiereactie geven. Figuur 4 laat de stand van zaken tot medio 2009 zien.

Constructen met selectiemerker

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

Constructen zonder selectiemerker

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

Figuur 4. Voorbeelden van enkelvoudige en gestapelde *R*-gencassettes in het DuRPh-project (situatie juli 2009).

c) Selectie

In dit project wordt gekeken of de resistentie tot expressie komt en of er geen storende variatie optreedt tussen verschillende plantendelen (somaclonale variatie). Dit gebeurt in het lab, kas en in veldproeven. Vermeerdering van pootgoed wordt gedaan in gaaskassen en op het veld in het noorden van het land op een pootgoedbedrijf. Figuur 5 laat het 'dambordefect' zien van resistente en gevoelige planten op een proefveld.



Figuur 5. Veldproef met Première in 2008 (nog met selectiemerker en enkelvoudig *R*-gen), vooraan (met blad) getransformeerd, linksachter het wildtype, drie weken na inoculatie met *P. infestans*.

d) Resistentiebeheer

Dit vindt op twee manieren plaats.

1. Het creëren van een dynamisch ras, dat wil zeggen planten met verschillende combinaties van *R*-gencassetes in hetzelfde ras. Door variatie van de verschillende *R*-gencassetes binnen het ras op verschillende plaatsen en tijdstippen is het ras ten aanzien van *Phytophthora*-resistentie dynamisch gemaakt. Om te weten welke *R*-genen effectief ingezet kunnen worden en om ze weer terug te trekken als er (te veel) *R*-genen van de cassette doorbroken zijn moet de *Phytophthora*-populatie gevolgd worden. Er is geen oneindige hoeveelheid *R*-genen beschikbaar, dus we moeten zuinig zijn op de beperkte voorraad.
2. Door te voorkomen dat er *Phytophthora*-populaties ontstaan die de resistentiegenen kunnen gaan doorbreken doordat ze muteren in hun avirulentiegenen. Toetsen worden opgezet om dergelijke mutaties in veldisolaties te kunnen opsporen. Dit is mogelijk doordat steeds meer moleculaire kennis van de grote aantallen verschillende avirulentiegenen (of effectoren) van *Phytophthora* beschikbaar komt en we inmiddels platforms hebben voor grootschalige multiplex-DNA-toetsen. Worden de mutanten op het veld gevonden, dan wordt via een gekoppelde *Decision Support System* (DSS) de juiste bestrijdingsstrategie gekozen.

e) Communicatie

Hier laten we zien aan belanghebbenden zoals consumenten, beleidsmedewerkers, politici, natuurorganisaties, boeren, kweekbedrijven en industrie wat we doen en waarom. Het is dan aan een ieder om zich een mening te vormen over de hier geschetste aanpak.

Ten slotte

Het huidige project kost € 1 miljoen per jaar. Als het principe blijkt te werken en als de wetgeving gunstig is voor cisgenese kunnen commerciële bedrijven samen met Wageningen UR voor een fractie van dat bedrag hun rassen upgraden.

Uitgangspunt is dat de inzet van fungiciden met 80% kan dalen en dat nog slechts tactisch hoeft te worden ingegrepen om het doorbreken van resistentie – waar die kans bestaat – tegen te gaan om er op die manier zo lang mogelijk profijt van te hebben.

Verder lezen

Haverkort AJ, Struik PC, Visser RGF & Jacobsen E (2009) Applied Biotechnology to Combat Late Blight in Potato Caused by *Phytophthora infestans*. *Potato Research* 52: 249-264

Aardappels, *Phytophthora* en genetische modificatie: het begin van een mening

Ton Rotteveel

E-mail: a.j.w.rotteveel@minlnv.nl

Inleiding

Genetische modificatie is een 'hot potato' die voor veel discussie zorgt: technisch, emotioneel, maatschappelijk en politiek. Eén van de spelers op het GGO-veld is de Commissie Genetische Modificatie, hier verder COGEM. Deze commis-

sie adviseert het ministerie van VROM inzake vergunningen voor genetisch gemodificeerde organismen (GGO). De redactie van Gewasbescherming vroeg de COGEM een artikel te schrijven over de *Phytophthora*-resistente aardappel in relatie tot regelgeving. De COGEM besloot geen artikel te schrijven, maar het wel toe te jui-