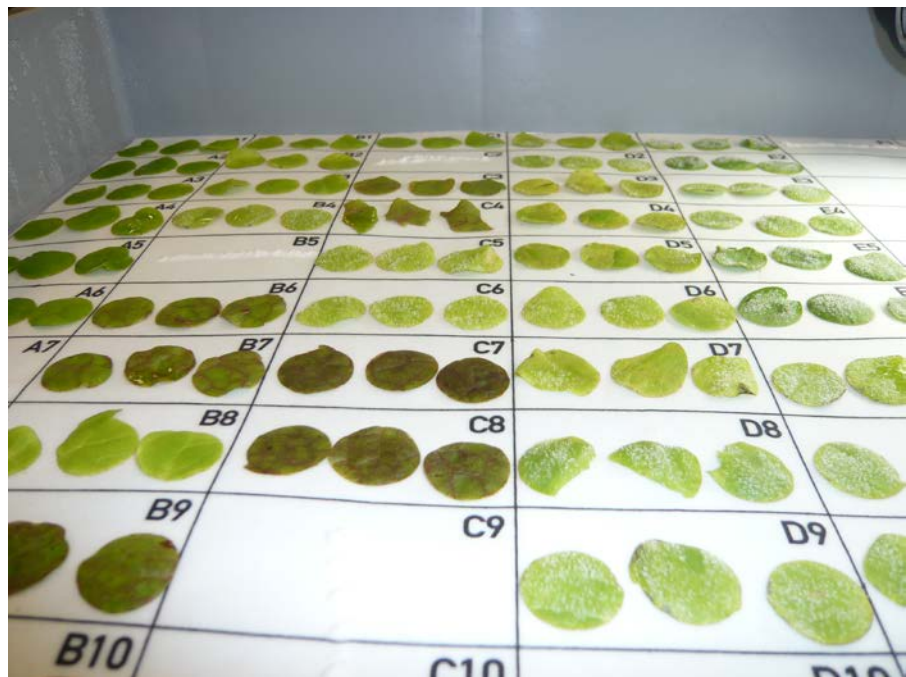


Christelijke Agrarische Hogeschool

Samensteller(s): Barend Gehner

Druk: 1



Resistentieveredeling

at dictaat dictaat dictaat dictaat dictaat **DICTAAT** dictaat dictaat dictaat dictaat dictaat di

Inhoudsopgave

Inhoudsopgave.....	2
1 Verschillende typen belagers van planten.....	4
1.1 Virussen en viroïden.....	4
1.2 Bacteriën.....	6
1.3 Schimmels.....	7
1.3.1 Biotrofen versus necrotrofen.....	7
1.3.2 Specialisten versus generalisten.....	8
1.3.3 Monocylich versus polycyclisch.....	8
1.4 Oomyceten.....	8
1.5 Nematoden of aaltjes.....	9
1.6 Insecten en spint.....	10
1.7 Air-borne versus soil-borne infecties.....	10
1.8 Samenvatting.....	11
2 Resistentie en tolerantie.....	12
2.1 Het verschil tussen resistentie en tolerantie.....	12
2.2 Resistentie d.m.v. een overgevoeligheidsreactie (Hypersensitive Response).....	12
2.3 Partiele resistentie (Intermediate Resistance).....	13
2.3.1 Veldresistentie.....	13
2.4 Voor- en nadelen van beide types resistentie.....	13
2.5 De naamgeving van resistentiegenen.....	14
2.6 Informatie over resistentie van veredelaars.....	16
3 Waardreeks, forma specialis, pathovars.....	17
3.1 De juiste ziekte bij de juiste plant.....	17
3.2 Waardreeksen, specialisten en generalisten.....	17
3.3 Forma specialis (f.sp.) en pathovar.....	17
3.4 Resistenties doorbreken: resistenties en avirulentiegenen.....	18
3.5 De gen-om-gen relatie en fysio's.....	19
3.6 Wat is een isolaat?.....	20
3.7 Samenvatting en voorbeelden naamgeving van pathogenen.....	20
4 De pathogenen-collectie.....	20
4.1 Hoe komt men aan inoculum.....	20
4.2 Het bewaren van inoculum.....	21
4.3 Verantwoord omgaan met pathogenen.....	21
5 Het uitvoeren van een ziekte-toets.....	22
5.1 Het te gebruiken plantmateriaal.....	22
5.2 De omvang van de toets.....	24
5.3 De methode van inoculatie.....	24
5.4 De juiste omstandigheden voor ziekteontwikkeling creëren.....	25
6 Het beoordelen van de toets.....	26
6.1 De componenten van resistentie.....	26
6.2 Severity: de mate van schade/necrose noteren.....	26
6.3 De incidentie: planten verdelen in “ziek” of “gezond”.....	27
6.4 Tellen van het ziekte- of plaagorganisme.....	27
6.5 Het ziekteverloop in de tijd: de latentieperiode.....	27
6.6 Het ziekteverloop in de tijd: de AUDPC.....	28
7 Problemen bij het beoordelen van proeven.....	29
7.1 Interplot interferentie.....	29
7.2 Ontsnappers.....	29
7.3 Vroegheidsverschillen.....	29

7.4	Het aanhouden van resistente planten	30
8	Het opsporen en inkruisen van een resistentie	30
8.1	Op zoek naar een resistentie	30
8.2	Terugkruisen.....	31
8.3	Koppeling	31
9	Merker gestuurde resistentieveredeling	31
10	Transgene resistentie	32
10.1	Bt-mais en -katoen	32
10.2	Virusresistentie door inbouwen van het virus-RNA	32
10.3	Andere mogelijkheden tot transgene resistentie.....	33
11	Bronvermelding/meer lezen	33

1 Verschillende typen belagers van planten

Planten worden belaagd door allerlei zaken. Wereldwijd leiden volgens cijfers van de FAO plantziekten en insecten samen tot een opbrengstverlies van circa 24%. In totaal gaat dus bijna een kwart van de oogst verloren door vraat en aantasting door belagende organismen. Dit geeft aan dat er veel bereikt zou kunnen worden met resistente gewassen.

Wie bezig is met resistentieveredeling zal vaak planten kunstmatig in aanraking gaan brengen met ziekteverwekkers. Dit heet “inoculatie”. Om te beginnen zullen we bekijken op welke manier we de belagers van planten kunnen verdelen in verschillende groepen. Later zullen we zien dat de verschillende groepen elk hun eigen aanpak van de veredelaar vereisen.

1.1 Virussen en viroïden

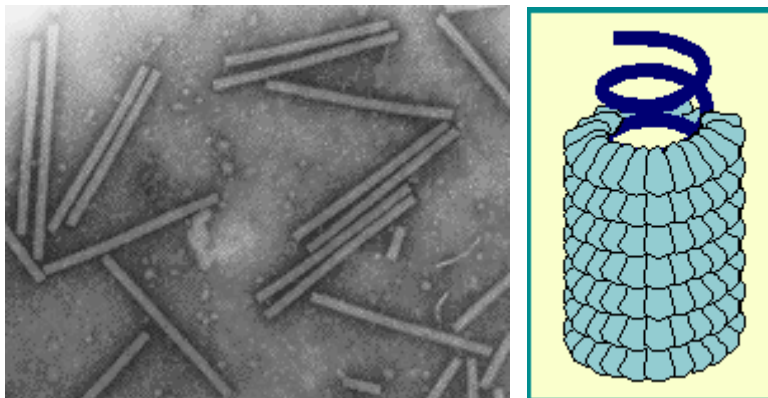


Fig. 1.1: Elektronenmicroscopische opname van een TMV (Tabaks mozaïek virus). De tekening ernaast geeft weer hoe het virus opgebouwd is: een spiraal van DNA met daaromheen een mantel van eiwitten.

Omdat virussen zich uitsluitend kunnen vermenigvuldigen in de cel van een organisme, is een virus volgens biologen geen organisme. Een virus is een virus... Virussen zijn zo klein dat men ze niet kan zien met een lichtmicroscop. Met een elektronenmicroscop lukt dit wel. Dit apparaat heeft men bijvoorbeeld bij Wageningen Universiteit.

De meest algemene manier om virussen aan te tonen is met serologische technieken, die gebruik maken van antilichamen die zijn opgewekt tegen virussen. Deze methode wordt **ELISA** genoemd, en is relatief eenvoudig uit te voeren. De meeste veredelingsbedrijven doen dit zelf, maar men kan dit ook uitbesteden. Een veel gebruikte manier om virussen aan te tonen m.b.v. antilichamen werkt als volgt:

1. Men koopt antilichamen in tegen het gewenste virus. (Deze zijn meestal geproduceerd door het virus in te spuiten in bijvoorbeeld een konijn of een geit. Het afweersysteem van het dier gaat vervolgens antilichamen tegen het virus aanmaken. Deze antilichamen zijn bedoeld om te hechten aan het virus.)
2. Transparante platen met “putjes” worden gecoat met het antilichaam. De wand van de “putjes” raakt zo bedekt met een laagje antilichamen tegen het gewenste virus.
3. Vervolgens wordt in elk putje een monster sap van een plant aangebracht.
4. Na enige tijd wordt de plaat leeggegoten en uitgespoeld.
5. Als het goed is, is nu enkel het virus (indien aanwezig) blijven plakken aan het laagje antilichaam in de putjes. Al het overige materiaal is verdwenen.
6. Nu brengt men weer antilichaam aan in de putjes. Deze keer echter antilichaam waaraan een stofje hangt dat men kan kleuren. Het antilichaam hecht uitsluitend aan de putjes waarin virus aanwezig is.

7. Vervolgens brengt men de kleurstof aan. Deze zorgt ervoor dat de putjes met virus erin een bepaalde kleur krijgen.
8. Men bekijkt welke putjes gekleurd zijn. Dit kan met het blote oog, maar ook met een speciaal apparaat dat licht door de plaat heen stuurt en meet of de putjes licht hebben geabsorbeerd.

Wanneer een virusdeeltje in een plantencel is beland, laat het zich vermenigvuldigen met behulp van de “apparatuur” die al in de cel aanwezig is. Het virus verspreidt zich vervolgens vaak door de hele plant, maar in de meeste gevallen niet tot in het meristeem. Ook weet het virus meestal niet het embryo in zaden te bereiken. Daardoor zijn de meeste virusziekten niet overdraagbaar naar de volgende generatie uit zaden.

Overdracht naar andere planten kan op twee manieren plaatsvinden. De eerste is **mechanische overdracht**. Dit gebeurt bijvoorbeeld wanneer je met een mes eerst in een zieke plant snijdt en daarna in een virusvrije plant. In sommige gevallen kan besmetting echter veel eenvoudiger optreden. Tabak in sigaretten bevat soms virussen die overgedragen kunnen worden wanneer men een plant stevig aanraakt of kneust. Een roker in de kas kan dus een risico zijn wat betreft virusoverdracht. Mechanische overdracht lukt echter niet bij alle virussen.

Sommige virussen worden (facultatief of uitsluitend) **door insecten verspreid**. Belangrijke verspreiders van virussen zijn bijvoorbeeld bladluis, wittevlieg en thrips. Virus kan aan de monddelen zijn blijven hangen, en wordt dan van plant naar plant gebracht. Een specifiekere overdracht (“persistent virus”) vereist dat het virus in het lichaam van het insect wordt opgenomen. Het insect vliegt vervolgens naar een volgende plant toe en prikt deze aan, waarbij virus-bevattend speeksel in de plant wordt gespoten. Doordat het virus in het lichaam van het insect een bepaalde ontwikkeling moet doormaken, is een insect meestal na het opzuigen van besmet plantensap niet direct besmettingsgevaarlijk.

Vergelijkbaar met virussen zijn viroïden. Een viroïd kan men beschouwen als een virus zonder mantel-eiwit. Dit levert onderzoekers de volgende moeilijkheid op: er is geen eiwit aanwezig waarop men materiaal kan toetsen in een ELISA. Hierdoor zal men voor een andere detectiemethode moeten kiezen. Er zijn twee mogelijkheden:

1. Moleculaire technieken. Men kan het RNA van het viroïd vermenigvuldigen en vervolgens detecteren.
2. PAGE gel. Men laat al het in de plant aanwezige RNA over een gel lopen door elektroforese. Wanneer men een bandje vindt op bepaalde plaats in de gel, is dit een aanwijzing dat het viroïd aanwezig is.

Op het moment is vooral het zogenaamde Potato Spindle Tuber Viroïd (PSTVd) van belang. (Men kan aan de afgekorte naam zien dat dit een viroïd is, deze eindigt namelijk op “Vd”. De afgekorte naam van een virus eindigt met een “V”.) PSTVd is een vervelend probleem in met name kuitplanten, aardappel en tomaat.

1.2 Bacteriën



Fig. 1.2: Een petrischaal met de bacterie *Pseudomonas sp.* De kleine vlekken zijn kolonies ontstaan uit 1 bacterie. Aan de bovenzijde van de schaal zijn de kolonies aan elkaar vast gegroeid doordat de bacteriën dicht bij elkaar op de schaal lagen in het begin van de kweek.

In tegenstelling tot virussen kan men bacteriën vaak vermeerderen op een kunstmatige voedingsbodem. Op de Fig 1.2. ziet men een petrischaal waarop bacteriën groeien.

Bacteriën zijn veel groter dan virussen. Onder de lichtmicroscop kan men ze nog net zien. Net als virussen kan men bacteriën vaak aantonen met antilichamen. Een andere detectiemethode is “uitplaten” (op een petrischaal zetten) en vervolgens met PCR bekijken of het de bacterie is die men had verwacht. PCR staat voor “polymerase chain reaction”. Bij deze methode kopieert men een stukje DNA dat specifiek is voor de bacterie waarop men wil toetsen. Wanneer het stukje DNA aanwezig blijkt te zijn, heeft men de bacterie aangetoond. Een belangrijk kenmerk van bacteriën is dat ze houden van warm weer en vocht. In Nederland ziet men deze omstandigheden soms in de zomer. In vooral tropische landen zijn de omstandigheden voor bacteriën echter nog veel beter en heeft men dan ook veel meer problemen met bacteriën.

Bacteriën kunnen goed verspreid worden via water. Bijvoorbeeld wanneer men aardappels beregent met oppervlaktewater. In de kas kunnen bacteriën verspreid worden door rondlopend personeel, men name wanneer het gewas nat is.

Uiteraard is slechts een gering aantal soorten bacteriën plant-pathogeen. Ze veroorzaken meestal rotting of afstervende plekken op bladeren en stengels. De meeste bacteriën zijn saprofyt en leven dus van organisch afval.

1.3 Schimmels



Fig. 1.3: De schimmel *Fusarium oxysporum* op een petrischaal. In het middel het plantmateriaal (een stukje stengel) waaruit de schimmel is geïsoleerd.

Schimmels maken meestal draadjes (“hyfen”) die over of door de plant heen groeien. Het geheel van deze hyfen noemt men “mycelium”. Het groeiende **mycelium** is een van de manieren waarop de schimmel zich kan verspreiden. Sommige schimmels maken een soort stevige “klontjes” mycelium, zogenaamde **sklerotien** of rattenkeutels. Deze kunnen soms jarenlang in de grond overleven.

Ook kunnen schimmels vaak **condiën** maken. Dit zijn ongeslachtelijke sporen. De schimmel produceert in dit geval een grote hoeveelheid sporen die vervolgens door de wind verspreid kunnen worden.

Tot slot kunnen schimmels soms **geslachtelijke sporen** produceren. Om dit mogelijk te maken moeten twee schimmels met elkaar paren. Geslachtelijke sporen kunnen nieuwe combinaties van genen opleveren. Precies wat een veredelaar met planten doet gebeurt op deze manier met de schimmel: er ontstaat nieuwe genotypen die aangepast kunnen zijn aan nieuwe omstandigheden. Een voorbeeld van nieuwe omstandigheden is een resistente plant. Wanneer een resistent ras wordt geteeld, kan geslachtelijke voortplanting van de schimmel het ontstaan van een nieuw type schimmel dat de resistentie doorbreekt vereenvoudigen. Onder de plantenzieken veroorzakende organismen, zijn schimmels het meest talrijk en gevarieerd. Overigens is een grote meerderheid van schimmels onschadelijk, en, evenals bij bacteriën, saprofyt.

1.3.1 Biotrofen versus necrotrofen

Verschillende schimmels hebben verschillende strategieën om zo goed mogelijk te overleven. De biotrofen leven op levend weefsel. De schimmel groeit bijvoorbeeld over het blad heen en prikt hier en daar naar binnen om voedsel van de plant “af te tappen”. Wanneer het weefsel van de plant sterft kan de schimmel geen voedsel meer aftappen. Daarom zorgt de schimmel ervoor dat het weefsel niet afsterft. Voorbeelden van biotrofen zijn de verschillende soorten meeldauw.

Necrotrofen gaan totaal anders met een plant om. Deze schimmels leven van dood weefsel, daarom produceren ze gifstoffen om de plant af te laten sterven. Een plant die ziek is van een necrotroof ziet er daarom vaak veel slechter uit dan een plant die ziek is van een biotroof.

Tabel 1.1: Vergelijking tussen biotrofen en necrotrofen

	Leeft van	Strategie	Produceert voor de plant giftige stoffen?	Voorbeelden
Biotroof	Levend weefsel	Voedsel “aftappen” van de plant	Nee	Meeldauwen, roesten
Necrotroof	Dood weefsel	Weefsel doden en “opeten”	Ja	<i>Sclerotinia</i> , <i>Pythium</i>

1.3.2 Specialisten versus generalisten

Sommige schimmels zijn geheel gespecialiseerd in één soort plant, en dus **specialist**. Wanneer men zo'n schimmel op een andere soort plant zet, wordt deze niet aangetast. Andere schimmels hebben een veel bredere **waardplantenreeks** en kunnen dus verschillende plantensoorten aantasten. Kennis hierover is van belang voor de veredelaar om te weten of het mogelijk is om een schimmel afkomstig van de ene plantensoort te gebruiken voor een toets bij een andere soort.

Een **specialist** is dus gespecialiseerd in een zeer beperkt aantal waardplanten. Een **generalist** kan leven op allerlei verschillende waardplanten. Enkele voorbeelden van specialisten zijn de groene perzikbladluis en *Botrytis cinerea*. Enkele voorbeelden van specialisten zijn dwergroest van gerst en de Coloradokever op aardappelachtigen.

1.3.3 Monocyclisch versus polycyclisch

Sommige schimmels besmetten één keer per jaar de planten: deze schimmels voltooien één levenscyclus per jaar en worden daarom **monocyclisch** genoemd. Andere schimmels produceren na infectie van een plant hetzelfde teeltseizoen alweer sporen en zorgen er zo voor dat de ziekte zich gedurende het seizoen steeds verder verspreidt. Schimmels die dit doen, noemt men **polycyclisch**. Wanneer een ziekte zich verspreidt in het gewas door middel van een tweede infectie, spreekt men van een **secundaire infectie**.

1.4 Oomyceten

Voorbeelden van Oomyceten zijn *Phytophthora*, *Bremia* en *Pythium*. Deze pathogenen lijken op schimmels maar zijn hier niet verwant aan. Net als schimmels hebben Oomyceten mycelium en sporen. Op DNA-niveau zijn de verschillen tussen “echte” schimmels en Oomyceten echter groot. Wanneer men een Oomyceet zonder met DNA te werken wil onderscheiden van een schimmel, moet men op details letten. Het mycelium van Oomyceten heeft geen septen (dit zijn een soort tussen-schotjes in het mycelium). Een ander belangrijk verschil tussen beide groepen is dat echte schimmels de stof chitine in de celwand hebben, en Oomyceten niet (of nauwelijks).

Ook oomyceten kunnen overleven en zich verspreiden dmv mycelium op gewasresten. Besmette aardappels die achterblijven op een akker kunnen bijvoorbeeld voor de infectie in het volgende jaar zorgen.

Oomyceten kunnen **ongeslachtelijke sporen** produceren die zichzelf voortbewegen door het water. De oomyceten houden dan ook meestal van natte omstandigheden.

Net als de schimmels maken ook oomyceten geslachtelijke sporen. Deze zorgen ook hier voor nieuwe combinaties van genen. Ook kunnen deze sporen vaak lang overleven en zo na meerdere jaren een nieuwe infectie op gang brengen.

1.5 Nematoden of aaltjes

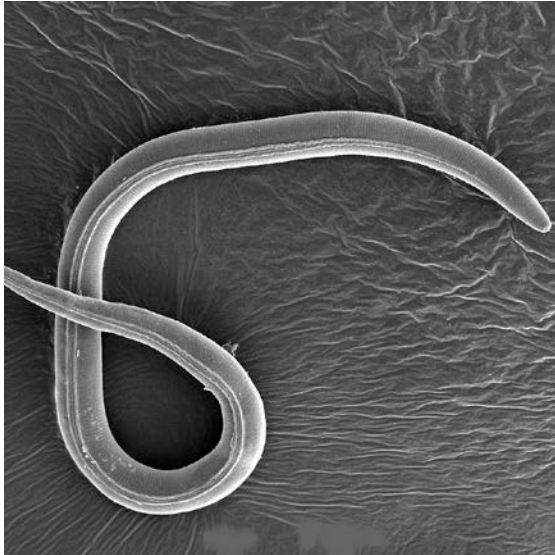


Fig. 1.4: Een nematode

Nematoden zijn kleine “wormpjes”. Sommige eten bijvoorbeeld bacteriën, maar er bestaan ook plantparasitaire nematoden. Ze kruipen door de grond naar de wortel van een plant en prikken deze aan. Sommige nematoden (*Globodera*, *Heterodera*) vormen een **cyste** met daarin eieren. Dit wordt bijvoorbeeld gedaan door het aardappel-cyste-aaltje. Een ander belangrijk type nematode is *Meloidogyne*, het wortelknobbel-aaltje. Nematoden zijn onder de microscoop bij een vergroting van 50x door een specialist vaak al te herkennen.

Nematoden zijn over het algemeen “grond gebonden”. Wanneer een perceel besmet is geraakt met nematoden, krijgt men deze niet makkelijk meer weg. Dat is de achtergrond van de maatregel om gewasrotatie toe te passen.

1.6 Insecten en spint



Fig. 1.5: Insecten op een knop.

Ook insecten en spintmijten kunnen zorgen voor schade. Dit kan op verschillende manieren:

- Zuig- of vraat-schade. Het insect eet delen van de plant op (kevers) of prikt de plant aan en zuigt sap op (luizen). Dit kost de plant energie.
- Vergroeiingen. De top van een plant die is aangeprikt door een insect vertoont vaak afwijkende groei.
- Roetdauw. Veel zuigende insecten scheiden suikerhoudend sap uit. Dit valt op de plant. Hierop kunnen vervolgens schimmels gaan groeien die het licht tegenhouden, zogenaamde roetdauw.
- Virusoverdracht. Misschien wel de vervelendste eigenschap van insecten is dat ze virussen overdragen. Via een bladluis kan een virus door de lucht grote afstanden afleggen. Op deze manier kan bijvoorbeeld een “schoon” veld met pootaardappelen besmet raken met allerlei virussen.

1.7 Air-borne versus soil-borne infecties

Infecties van plantziekten zijn in principe air-borne of soil-borne. Air-borne betekent letterlijk dat een infectie uit de lucht afkomstig is. Hiervan is bijvoorbeeld sprake wanneer schimmelsporen ergens landen. Een ziekte die zich air-borne verspreidt, kan vaak snel grote afstanden overbruggen en soms zelfs een oceaan oversteken.

Soil-borne ziekten zijn bodemgebonden en verspreiden zich vaak nauwelijks op een andere manier. Deze pathogenen overbruggen meestal niet zo snel grote afstanden. Een probleem is wel dat ze vaak lang overleven in de grond en dan ook zeer lang voor problemen blijven zorgen wanneer een perceel besmet is geraakt. Bij dit soort pathogenen is het van belang verspreiding over langere afstanden via landbouwmachines en pootgoed tegen te gaan.

Tabel 1.2: Verschillen tussen air-borne en soil-borne infecties

	Voorbeelden	Verspreiding	Verblijf op perceel
Air-borne	Zwevende sporen, vliegende insecten	Snel door de lucht over grote afstanden	Vaak na 1 seizoen weer weg
Soil-borne	Mycelium, sclerotien, nematoden in de grond	Traag, b.v. aan de ploeg naar het volgende perceel	Blijft vaak jarenlang een probleem op een perceel

1.8 Samenvatting

Voor het overzicht volgt hier een tabel waarin de verschillende belagers van planten op een rijtje worden gezet.

Tabel 1.3: Overzicht van verschillende typen belagers van planten

Belager	Voorbeelden	Verspreiding	Overleving
Virus mechanisch/ via insecten	TMV, CyMV TSWV	Mechanisch (plantensap), insecten	In planten, soms in gewasresten
Bacterie	Bruinrot	Water (irrigatie of spetters)	Bacterie zelf, soms bacteriesporen
Schimmel biotroof /necrotroof specialist /generalist	Meeldauw, roest <i>Sclerotinia</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Rhizoctonia</i>	Sporen (door de lucht), mycelium (via grond)	Sporen, mycelium, sclerotien
Oomyceet	<i>Phytophthora</i> , <i>Pythium</i> , <i>Bremia</i>	Sporen (door de lucht), mycelium (via grond)	Sporen, mycelium
Nematode	Aardappelmoehheid, wortelknobbelaaltjes	Door de grond	In de grond, evt als eieren/cysten
Insect	Bladluis, thrips, wittevlies	Vaak (maar niet altijd) door de lucht	

2 Resistentie en tolerantie

Sommige planten zijn niet vatbaar voor een bepaalde schimmel, terwijl ze wel tot de waardplantsoort behoren. Dit kan het gevolg zijn van één of meerdere **resistentie-genen** in de plant. Dit hoofdstuk gaat over verschillende manieren waarop **plantenrassen** die resistent kunnen zijn tegen of tolerant voor bepaalde belagers.

2.1 Het verschil tussen resistentie en tolerantie

Wanneer een pathogeen niet op een plant kan groeien spreekt men van **resistentie**. Wanneer een pathogeen wel op de plant groeit, maar de plant hier geen (of minder) last van heeft, spreekt men van **tolerantie**. In onderstaande tabel bekijken we hoe een vatbaar, resistent en een tolerant type reageert op een verkoudheid.

Tabel 2.1: Tolerantie en resistentie bij de mens

Virus concentratie in bloed	Ziek of gezond?	Vatbaar, resistent of tolerant
100	Ziek	Vatbaar
0	Gezond	Resistent
100	Gezond	Tolerant

Tabel 2.2: Tolerantie en resistentie bij de tomaat

Gemeten virusconcentratie	Opbrengst	Vatbaar, resistent of tolerant
100	Laag	Vatbaar
0	Hoog	Resistent
100	Hoog	Tolerant

2.2 Resistentie d.m.v. een overgevoeligheidsreactie (Hypersensitive Response)

Resistentie d.m.v. een overgevoeligheidsreactie is in de praktijk op het moment de meest toegepaste vorm van resistentie in de plantenveredeling. Deze vorm van resistentie werkt grofweg als volgt:

1. De plant merkt de aanwezigheid van de schimmel op door een stofje in de schimmel (een eiwit) te herkennen wanneer de schimmel naar binnen groeit.
2. Als reactie op de herkenning van de schimmel laat de plant een stukje weefsel afsterven: **de overgevoeligheidsreactie**. Bovendien produceert de plant ook allerlei stoffen om zichzelf te verdedigen tegen de schimmel.
3. De schimmel kan op deze manier niet groeien op de plant en sterft af.

Meestal kan men de resistentiereactie met het blote oog waarnemen als een klein zwart-bruin vlekje op de plek waar de schimmel de plant is binnengedrongen. Echter, soms is de reactie van de plant zo snel en hevig, dat de overgevoeligheidsreactie beperkt blijft tot één cel. In dat geval ziet men met het blote oog geen reactie, en heeft men een microscoop nodig. In weer andere gevallen is de overgevoeligheidsreactie laat en zwak, en stopt het de infectiepoging niet volledig. Dan ziet men rond de sporulerende schimmel bruin- of geelverkleuring van bladweefsel. Deze vorm van resistentie is in de plantenveredeling van groot belang. Veredelaars proberen zo snel mogelijk rassen te ontwikkelen met resistenties tegen allerlei

belangrijke pathogenen. Doordat deze vorm van resistentie meestal op één gen berust, is inkruisen relatief eenvoudig.

Overigens noemen we hier de overgevoeligheidsreactie als optredend tegen een schimmelpathogeen. Echter, het verschijnsel doet zich voor tegen alle klassen van plantpathogenen, van virussen tot en met nematoden en zelfs sommige insecten.

2.3 Partiele resistentie (Intermediate Resistance)

Een andere vorm van resistentie is partiële resistentie. In dit geval is de plant niet geheel resistent tegen het pathogeen maar slechts deels. Het pathogeen vermeerdert zich moeizaam op de plant, zodat een (veel) lagere epidemieopbouw ontstaat dan op een meer vatbare plant. Het is dus meer een “verminderde vatbaarheid”, en berust meestal niet op een overgevoeligheidsreactie.

Partiële resistentie berust meestal op het gezamenlijke effect van meerdere genen. Men spreekt daarom van een polygene vorm van resistentie. Dit maakt inkruisen van partiële resistentie een heel stuk moeilijker dan het inkruisen van een absolute resistentie, die berust op slechts één gen. Groot voordeel van partiele resistentie is echter dat deze moeilijk te doorbreken is. Wanneer men een resistentie van dit type dus eenmaal heeft ingekruist, heeft men hier nog lang plezier van. Daarom kan men spreken van een duurzaam type resistentie

2.3.1 Veldresistentie

Veldresistentie is resistentie die zich (vooral) in het veld manifesteert. Deze vorm van resistentie plaats ik onder partiele resistentie omdat vaak meerdere genen betrokken zijn, de werking breed kan zijn en de resistentie meestal niet absoluut is. Veldresistentie op verschillende manieren ontstaan. Een voorbeeld is een beter plantmodel, waardoor het blad minder contact maakt met de grond, en hierdoor moeilijker te bereiken is voor pathogenen die in de grond overleven. Ook kan men denken aan planten met meer ruimte tussen de bladeren, waardoor ze beter opdrogen.

Veldresistentie is meestal moeilijk te meten. Op blad(-ponsjes) of zaailing-niveau kan men meestal geen enkele resistentie ontdekken. Pas wanneer men test in het veld komt de resistentie aan het licht. Dit maakt deze vorm van resistentie minder eenvoudig om mee te werken, maar er bestaan zeker interessante mogelijkheden.

2.4 Voor- en nadelen van beide types resistentie

Tabel 2.3: Vergelijking tussen verschillende vormen van resistentie

Type resistentie	Bescherming	Duurzaamheid	Aantal betrokken genen
Overgevoeligheidsreactie	(Vrijwel) 100%	Soms eenvoudig te doorbreken (dus minder duurzaam)	één (relatief eenvoudig in te kruisen)
Partiele resistentie	Deels	Meestal zeer lastig te doorbreken (duurzaam)	Meerdere (lastiger in te kruisen)

In tabel 2.3. wordt resistentie dmv een overgevoeligheidsreactie (HR) vergeleken met partiële resistentie. We zien dat de eerste vorm makkelijker in te kruisen is omdat deze slechts op één gen berust. De tweede vorm is echter meestal duurzamer. Er zijn echter ook partiële

resistenties die van voldoende niveau zijn, en op slechts één gen berusten. De veredelaar ziet natuurlijk bij voorkeur een resistentie die op slechts 1 gen berust en toch niet doorbroken wordt. Ook deze vorm van resistentie kan bestaan.

De kans op doorbreking van een resistentie hangt niet alleen af van het soort resistentie (overgevoelig of niet), maar ook van het type pathogeen, en van de grootte van het areaal waarop het ras met een bepaald resistentiegen wordt verbouwd. Resistentie tegen bodempathogenen en virussen worden bijvoorbeeld minder frequent doorbroken dan resistenties tegen air-borne pathogenen als meeldauw, roest en *Phytophthora infestans*.

2.5 De naamgeving van resistentiegenen.

De naamgeving van resistentiegenen wisselt per plant-ziekteverwekker-combinatie. Vaak wordt gebruik gemaakt van letters die verwijzen naar de wetenschappelijke naam (bijvoorbeeld Cf-gen is resistentie tegen *Cladosporium fulvum* in tomaat) of de populaire naam van het pathogeen (Lr-genen voor resistentie van tarwe tegen Leaf Rust, *Puccinia triticina*) van het pathogeen. Zie voorbeelden van nomenclatuur van genen bij tomaat (Tabel 2.4). Omdat tegen de meeste pathogenen er meerdere resistentiegenen zijn gevonden, worden deze meestal aangeduid met een volgnummer (bijvoorbeeld Cf1, Cf2, etc.)

Tabel 2.4: Informatie over resistenties, afkomstig van de website van De Ruiter Seeds

version October 2007
Tomato
Coderingen resistenties tomaat
 bron: website De Ruiter Seeds

Scientific name	English common name	Code	HR	IR	Comment
Viruses:					
Cucumber Mosaic Virus	Cucumber mosaic	CMV	•	•	
Tomato Mosaic Virus	Tomato mosaic	ToMV	•		
Tomato Marchitez Virus	Marchitez	ToTV	•		ToTV resistance also works against ToMarV.
Tomato Spotted Wilt Virus	Tomato Spotted wilt	TSWV	•		Even in resistant varieties, a minor percentage of infected plants can be found.
Tomato Torrado Virus	Torrado	ToTV	•		
Tomato Yellow Leaf Curl Virus	Tomato yellow leaf curl	TYLCV	•	•	
Bacteria:					
Clavibacter michiganensis pv. michiganensis	Bacterial canker	Cmm		•	
Pseudomonas syringae pv. Tomato	Bacterial speck	Pst	•		
Ralstonia solanacearum	Bacterial wilt	Rs		•	
Xanthomonas vesicatoria (ex-Xanthomonas campestris pv. vesicatoria)	Bacterial spot	Xv		•	
Fungi:					
Alternaria alternata f.sp.lycopersici	Alternaria stem canker	Aal	•		
Fulvia fulvum (ex Cladosporium fulvum)	Leaf mold	Ff	•		Strains A,B,C,D,E are now indentified as strains 1,2,3,4,5 respectively in the new Coding. Cf:1-5=Cf:1,2,3,4,5
Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici	Fusarium wilt	Fol	•		Strains 0,1,2 exist (see note) Fol:0,1,2 = Fol:0-2
Fusarium oxysporum f.sp.radicis-lycopersici	Fusarium crown and root rot	For	•		
Leveillula taurica	Powdery mildew	Lt	•		
Oidium neolycopersici (ex Oidium lycopersici)	Powdery mildew	On	•	•	
Phytophthora infestans	Late blight	Pi		•	
Pyrenochaeta lycopersici	Corky root rot	Pl	•	•	
Stemphylium botryosum f.sp.lycopersici	Gray leaf spot	Sbl	•		
Stemphylium lycopersici (ex S. floridanum)	Gray leaf spot	Sl	•		
Stemphylium solani	Gray leaf spot	Ss	•		
Verticillium albo-atrum	Verticillium wilt	Va	•		
Verticillium dahliae	Verticillium wilt	Vd	•		
Nematodes:					
Meloidogyne arenaria	Root-knot	Ma	•	•	Range: High resistance up to approx. 28C soil temperature. Above this temperature varieties are increasingly susceptible.
Meloidogyne incognita	Root-knot	Mi	•	•	
Meloidogyne javanica	Root-knot	Mj	•	•	
Physiological					
Silvering		Si	•		

2.6 Informatie over resistentie van veredelaars

We gaan nu bekijken hoe een veredelaar per ras aangeeft welke resistenties zijn tomatenrassen hebben. Wij hebben geleerd om te spreken over:

- Resistenties, absoluut of partieel (als het pathogeen wordt geremd of gestopt)
- Toleranties (als de plant de aanwezigheid van het pathogeen verdraagt)



Wat bij een rondgang langs de websites van veredelaars opvalt, is dat het onderscheid tussen deze zaken meestal niet duidelijk aangegeven wordt. De meeste veredelaars verdelen de resistenties enkel in

- Geheel resistent (High resistance)
- Deels resistent (Intermediate resistance, tolerant, veldresistentie)

Met “Geheel resistent” zullen ze meestal een absolute resistentie dmv een overgevoelighedsreactie bedoelen. Met “deels resistent” (hiervoor gebruiken ze soms ook de termen (tolerant of veldresistentie) bedoelen ze waarschijnlijk meestal een partiele resistentie of op een tolerantie.

Wanneer men werkt als veredelaar, wil men precies weten wat er aan de hand is, om op de juiste wijze te kunnen werken aan nieuwe rassen. Wanneer men planten koopt om te telen, is het precieze mechanisme veel minder belangrijk. Dit is de reden waarom veredelaars meestal geen onderscheid maken tussen resistent, partieel resistent of tolerant.

Tabel 2.5: Resistenties van enkele tomatenrassen (bron: De Ruiters Seeds)

Name	High Resistance (HR)	Intermediate Resistance (IR)
 <u>Caramba</u>	HR ToMV/Ff:1-5/Fol:0,1/Va/Vd/Ma/Mi/Mj	IR
 <u>Erophily</u>	HR ToMV/Ff:1-5/Fol:0,1/Va/Vd/Ma/Mi/Mj	IR Pi/PI

3 Waardreeks, forma specialis, pathovars

In dit stuk zal het gaan om de **plantensoorten** die een belager kan infecteren.

3.1 De juiste ziekte bij de juiste plant

Belagers van planten zijn in meer of mindere mate gespecialiseerd op een bepaalde plantensoort. Een ziekte die de ene plantensoort in een mum van tijd zwaar beschadigt, kan bij een andere plantensoort vaak totaal geen kwaad.

3.2 Waardreeksen, specialisten en generalisten

De lijst van plantensoorten die succesvol geïnfecteerd kunnen worden door een bepaald pathogeen of plaag noemt men de **waardreeks**. Wanneer een pathogeen een kleine waardreeks heeft, spreekt men van een **specialist**. Enkele voorbeelden van specialisten zijn: dwergroest op gerst en Coloradokever op aardappelachtigen.

Wanneer de waardreeks erg breed is spreekt men van een **generalist**. Enkele voorbeelden hiervan zijn: de groene perzikbladluis en *Botrytis cinerea*. Deze twee pathogenen belagen beide een groot aantal plantensoorten.

3.3 Forma specialis (f.sp.) en pathovar

Binnen de soort van een schimmel (Bijvoorbeeld de meeldauw-soort *Blumeria graminis*) kunnen verschillende varianten voorkomen die elk gespecialiseerd zijn op aantasting van één bepaalde plantensoort. Van de genoemde meeldauw *Blumeria graminis* bestaat bijvoorbeeld de forma specialis *tritici*. Deze noemen we voluit *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*. Deze forma specialis is alleen in staat om tarwe (en enkele nauwe verwanten daarvan) te infecteren. Andere granen en grassen zoals gerst, rogge of haver zijn niet geschikt. Daarop komen weer andere meeldauwvormen (meervoud *formae speciales*) voor.

Interessant is dat wanneer binnen een soort twee of meer verschillende f.sp. voorkomen, het meestal onmogelijk is om een verschil tussen de vormen schimmels te ontdekken, terwijl ze niet in staat zijn om de waardplanten van elkaar te infecteren. Moleculair onderzoek suggereert soms nauwe en soms relatief verre verwantschap tussen verschillende *formae speciales* van een pathogeen.

Tabel 3.1: Enkele verschillende *formae speciales* van een roest

Naam	Waardplant
<i>Puccinia striiformis</i> f.sp. <i>poae</i>	gras
<i>Puccinia striiformis</i> f.sp. <i>tritici</i>	tarwe
<i>Puccinia striiformis</i> f.sp. <i>hordei</i>	gerst

Een vergelijkbaar verschijnsel ziet men ook bij bacteriën. Hier spreekt men echter vaak van pathovars.

Tabel 3.2: Enkele verschillende pathovars van een bacterie

Naam	Waardplant
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	kers
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	tabak
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	boon
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	tomaat

3.4 Resistenties doorbreken: resistenties en avirulentiegenen

Zoals we gezien hebben, kunnen planten resistent zijn tegen een pathogeen. Helaas kunnen plantpathogenen deze resistentie echter vaak “**doorbreken**”. Een resistentie is doorbroken wanneer er een nieuwe variant van het pathogeen ontstaat die in staat is om een plant met het resistentie-gen te infecteren.

Hoe doorbreekt een pathogeen een resistentie? Zoals we gezien hebben herkent de plant een onderdeel van de schimmel (een eiwit). Door een mutatie van de schimmel kan het DNA dat codeert voor dit eiwit kapot gaan. Meestal is het negatief wanneer een stuk DNA kapot gaat: het gevolg is dat een bepaald eiwit niet meer gemaakt kan worden, waardoor de schimmel bijvoorbeeld slechter groeit. In dit geval is de mutatie echter positief: dankzij de mutatie wordt de schimmel niet meer herkend door de plant!

Zoals we bij de plant spreken van resistentiegenen, spreken we bij de schimmel van **avirulentiegenen**. Resistentiegenen zijn de genen waarmee de plant een pathogeen ontdekt. Avirulentiegenen zijn de genen in de schimmel die coderen voor de eiwitten die ervoor zorgen dat de plant hem herkent.

Figuur 3.1: Het doorbreken van een resistentie

Situatie 1: Resistentie	
Plant	Pathogeen
Bevat een resistentiegen	Bevat een avirulentiegen .
Het resistentiegen zorgt ervoor dat de plant een eiwit van het pathogeen ontdekt en hierop reageert.	Het avirulentiegen codeert voor het eiwit dat herkend wordt door de plant.
Ergens op een van de velden waarop een resistent gewas wordt geteeld, kan nu een mutatie optreden in een cel van het pathogeen. Door deze mutatie kan het avirulentiegen kapot gaan. Het pathogeen produceert hierdoor het eiwit dat herkend wordt door de plant niet meer. In dit geval is de resistentie doorbroken.	
Situatie 2: Doorbroken resistentie	
Plant	Pathogeen
Bevat een resistentiegen	Bevat het avirulentiegen niet meer.
Het resistentiegen zorgt ervoor dat de plant een eiwit van het pathogeen ontdekt en hierop reageert.	Het eiwit dat de resistente plant kan herkennen, wordt niet meer geproduceerd. De plant herkent deze schimmel dus niet!
Het avirulentiegen van het pathogeen codeert waarschijnlijk voor een eiwit dat nut heeft voor het pathogeen. In een veld met een resistent gewas is het gemis van dit nuttige eiwit echter veel minder belangrijk dan het voordeel dat het pathogeen niet meer herkend wordt door het resistente gewas. Hierdoor heeft het pathogeen een groot selectievoordeel en kan het zich goed vermenigvuldigen.	

De schimmel kan het eiwit waaraan hij herkend wordt weglaten. Wanneer dit lukt, wordt de schimmel niet meer herkend, en induceert hij dus geen resistentiereactie. Dan is de resistentie doorbroken.

Resistenties aan de kant van de plant zijn meestal dominant. Een allel voor resistentie wordt daarom aangegeven met (hoofdletter) R en een allel waarop de resistentie ontbreekt met r. Aan de kant van het pathogeen geldt: avirulentie (dus WEL herkend worden) is dominant, daarom wordt een allel dat hiervoor zorgt aangegeven met A; wanneer het eiwit niet meer geproduceerd wordt, noemt men het allel a.

In de praktijk wordt dus eerst een speciaal plantenras ontwikkeld met een resistentiegen dat effectief beschermt tegen een pathogeen. Vervolgens kan binnen kortere of langere tijd een speciaal “schimmel-ras” ontstaan dat het resistentiegen heeft doorbroken. Een dergelijk “schimmel-ras” noemt men een **fysio**. Wanneer het om een bacterie gaat spreekt men over een **pathotype**.

3.5 De gen-om-gen relatie en fysio's

Wanneer een resistentie doorbroken is, kan de veredelaar opnieuw op zoek gaan naar resistentie. Dat wil zeggen: de veredelaar gaat op zoek naar een resistentiegen dat een eiwit herkent dat het pathogeen nog wel produceert. Wanneer dit spel zich enkele keren herhaalt, ontstaat een ras met verschillende resistentiegenen en een pathogeen dat verschillende eiwitten niet meer produceert (door avirulentiegenen kwijt te raken). De relatie van steeds 1 gen uit de plant met 1 gen in het pathogeen noemt men de **gen-om-gen relatie**.

Een type schimmel dat bepaalde avirulentiegenen wel bezit en andere niet, noemt men een **fysio**. Een **fysio krijgt meestal de naam van de resistentiegenen die omzeild worden. Dat wil zeggen: van de avirulentiegenen die het NIET bezit.**

Hierbij enkele voorbeelden van combinaties van planten en pathogenen met verschillende resistentie- en avirulentiegenen.

Tabel 3.1: Resistentie- en avirulentiegenen

Genoom plant	Fenotype plant	Genoom pathogeen	Fenotype pathogeen	Naam fysio	De plant is...
R1r1	R1	A1a1	A1		Resistent
r1r1	r1	A1a1	A1		Vatbaar
R1R1	R	a1a1	a1	1	Vatbaar
r1r1R2r2	r1R2	A1a1a2a2	A1a1	1	Vatbaar
r1r1r2r2R3r3	r1r2R3	a1a1a2a2A3a3	a1a2A3	1,2	Resistent

3.6 Wat is een isolaat?

Als veredelaar zul je het woord isolaat soms tegenkomen. Met een isolaat bedoelt men een vorm van een pathogeen die men in het veld verzameld heeft en vervolgens op levend plantmateriaal of kunstmatig zo zuiver mogelijk in stand houdt. Van een isolaat kan men vervolgens gaan uitzoeken tot welk fyso of pathotype het behoort. In sommige gevallen kan men tot de conclusie komen dat sprake is van een nog niet eerder ontdekte vorm van het pathogeen.

Het is belangrijk om het juiste onderscheid tussen de termen isolaat en fyso of pathotype te maken. Een isolaat is dus iets wat men in het veld isoleert. Van het isolaat kan men vervolgens uitzoeken tot welk fyso of pathotype het behoort.

3.7 Samenvatting en voorbeelden naamgeving van pathogenen

Naamgeving van Fyso's en pathotypen:

Bij schimmels en oomyceten spreekt men van fyso's, bij bacteriën spreekt men van pathotypen. De naamgeving wisselt per plant-ziekteverwekker-combinatie. Meestal worden nummers of letters gebruikt. Soms, zoals bij sla, een chronologische nummering, met een code van het land (NL=Nederland) waar het fyso is gevonden. Wanneer men met een pathogeen aan de slag gaat moet men uitzoeken hoe men de fyso's of pathotypen benoemt. Dit vindt men o.a. op de websites van veredelingsbedrijven. Hieronder een voorbeeld voor een dwergroest-fyso:

Naam: *Puccinia hordei* fyso 1,2,4/3

Geslacht: *Puccinia*

Soort: *hordei*

Doorbroken resistenties (dus kan planten met de resistentiegenen infecteren): 1,2 of 4

Niet-doorbroken resistenties (dus kan planten met dit resistentiegen niet infecteren): 3

Voor een andere plantziekte kan de naamgeving van de fyso's echter totaal anders in elkaar zitten. Daarom is het van belang om je als veredelaar goed in te lezen wanneer je met een bepaald pathogeen aan de slag gaat.

4 De pathogenen-collectie

4.1 Hoe komt men aan inoculum

Er bestaan verschillende manieren om aan pathogenen voor een ziekte-toets te komen:

1. Zelf isoleren. Het voordeel hiervan is dat men er zeker van is dat de isolaten "vers uit de praktijk" komen. Men kan het beste gebruik maken van zieke planten afkomstig uit het gebied waarvoor men veredelt, mits dat gebied niet op een ander continent ligt. Men wil namelijk niet de introductie van een exotisch en potentieel gevaarlijke pathogeenstam op zijn geweten hebben! De Plantenziektenkundige Dienst (PD) kan informatie verschaffen over de toelaatbaarheid van introductie van pathogeenstammen uit het buitenland. Voor identificatie van een gesignaleerd pathogeen kan men bij de PD en het CBS aankloppen voor determinatie.
2. Bestellen bij een gespecialiseerde instelling. Bij sommige bedrijven kan men pathogenen bestellen. Soms kan het bedrijf informatie verstrekken over de isolaten die men verkoopt, zoals tot welk fyso hun isolaten behoren.

3. Instandhouding door de concurrent. Sommige pathogenen hebben erg veel verschillende fysio's. In dit geval spreken concurrerende bedrijven soms af om met elkaar samen de verschillende fysio's in stand te houden. Binnen de groentezaadsector speelt de Naktuinbouw hier een coördinerende rol in.

4.2 Het bewaren van inoculum

Het ene pathogeen laat zich eenvoudiger bewaren dan het andere. In het gunstigste geval kan men sporen jarenlang invriezen of in vacuüm bewaren. Soms is dit echter niet mogelijk en moet men een pathogeen in stand houden op een voedingsbodem (medium) op petrischalen of zelfs op levend plantmateriaal. Dit laatste is het geval bij zogenaamde **obligate parasieten**. Men spreekt van een obligate parasiet wanneer kunstmatige kweek niet mogelijk is. In dit geval kan men het pathogeen enkel in stand houden/vermenigvuldigen op een levende waardplant. Dit is bijvoorbeeld het geval bij meeldauw.

Enkele manieren waarop men een pathogeen in stand kan houden:

- Invriezen -80°C of vloeibare stikstof (meerdere jaren). Dit kan bijvoorbeeld met sporen van roest en *Phytophthora infestans*.
- Invriezen -20 (1 jaar). Dit kan bijvoorbeeld met *Bremia* op plantmateriaal, bacteriën, en sommige virussen.
- Op medium in de koelkast. Dit doet men onder andere met *Fusarium*
- Op levende planten. Dit is onder andere nodig bij sommige virussen, alle meeldauwsoorten en bij *Meloidogyne*.

In stand houden op levende planten kost natuurlijk meer geld en ruimte dan invriezen. Ook is er meer risico op vermenging van verschillende fysio's. Daarom probeert men methodes te vinden om de pathogenen zo eenvoudig en lang mogelijk in stand te houden.

Een risico dat men loopt wanneer men een pathogeen lang doorkweekt op voedingsbodems, is dat het vermogen om een plant te infecteren vermindert of verdwijnt. Een schimmel heeft op een voedingsbodem een gemakkelijk leventje. De schimmel krijgt zonder iets te hoeven doen suikers aangeboden. Dit kan ertoe leiden dat de schimmel de eigenschappen die nodig zijn om een plant te infecteren verliest. De pathogeniteit kan men op peil houden door de schimmel af en toe op een plant te zetten en te herisoleren.

4.3 Verantwoord omgaan met pathogenen

Als veredelaar wil je natuurlijk niet dat de burens ook last krijgen van de plantziekten waarmee je werkt. Daarom is het van belang om na te denken of een ziekte-toets risico's inhoudt op verspreiding van een gevaarlijk, nieuw en agressief pathogeen. Toetsen met algemeen voorkomende pathogeen-isolaten die in eigen regio zijn verzameld vereisen geen extra voorzorgsmaatregelen, maar toetsen met extra agressieve en exotische isolaten moeten erg zorgvuldig worden uitgevoerd.

Sommige organismen worden beschouwd als quarantaine-organismen. Dit betekent dat het de bedoeling is om Nederland geheel vrij van deze organismen te houden. Wanneer een quarantaine-organisme opduikt in een gewas, is de betrokken teler verplicht om dit te melden aan de plantziektkundige dienst. Vervolgens dient (verspreiding van) de ziekte volgens een streng protocol te worden vermeden. Met quarantaine-organismen gaat de veredelaar natuurlijk extra voorzichtig om.

Een pathogeen in een kas verspreidt zich moeilijker dan een pathogeen op een proefveld. Wanneer men er extra zeker van wil zijn dat een pathogeen niet ontsnapt, kan men

een speciale kas gebruiken waarin de luchtdruk kunstmatig lager wordt gehouden dan die van de omgeving. Dit leidt ertoe dat sporen niet uit het compartiment kunnen ontsnappen als er een deur opengaat of wanneer de kas ergens een lekje heeft. Air-borne pathogenen verspreiden zich uiteraard veel gemakkelijker en verder dan soil-borne pathogenen.

Het kan zinvol zijn om na afloop van een proef materiaal te autoklaveren. Een autoclaaf is een apparaat waarin men materiaal onder een hoge druk aan hoge temperaturen bloot kan stellen. Dit kan men gebruiken om ziekteverwekkers te vernietigen.

5 Het uitvoeren van een ziekte-toets

Stel: men heeft planten die men wil toetsen op resistentie tegen een pathogeen. Dan is vervolgens de vraag: hoe gaan we de toets uitvoeren. Er bestaan een heleboel verschillende manieren, elk met hun eigen voor- en nadelen. Meestal heeft dit betrekking op de prijs (hoeveel werk/ruimte nodig) en op de kwaliteit (hoe betrouwbaar is de uitslag). In dit hoofdstuk zetten we de verschillende methodes met hun voor- en nadelen op een rijtje.

5.1 Het te gebruiken plantmateriaal

- Bladponsjes in klimaatcel. Men snijdt ronde stukjes uit een blad en legt deze op vochtig papier in een bak in de klimaatcel. (Deze methode is goedkoop, lijkt echter weinig op de werkelijkheid, daarom goed opletten of de resultaten overeenkomen met de werkelijkheid!) Voordeel is dat men veel verschillende fysio's kan toetsen op 1 plant. Uit 1 plant snijdt men immers een groot aantal ponsjes.
- Detached leaf-methode. Vergelijkbaar met bladponsjes maar dan neemt men een compleet blad. Dit lijkt alweer een klein beetje meer op de werkelijkheid, er is veel minder in het materiaal gesneden.
- Zaailingen in de kas/klimaatcel. Men zaait enkele plantjes die men wil toetsen in de kas of in de klimaatcel. De kleine plantjes nemen minder plaats in dan een volwassen plant. Het is echter bekend dat bepaalde vormen van resistentie ontwikkelingsstadium afhankelijk zijn. Resultaten behaald in zaailingen zijn daarom lang niet altijd in overeenstemming met resultaten in volwassen planten.
- Volwassen planten in kas of vollegrond (Dit komt goed overeen met werkelijkheid, maar duur!)
- Het geogste product, bijvoorbeeld aardappelen, bloembollen enz. Dit materiaal gebruikt men met name wanneer men wil toetsen op resistentie tegen bewaarziekten.

Bij de keuze van het te gebruiken plantmateriaal dient men altijd goed na te gaan of de toets goed overeenkomt met de praktijk. Bij toetsing van appels op een bepaalde meeldauw bleek bijvoorbeeld dat resistentie op zaailing-niveau niet betekent dat de volwassen boom ook resistent is.

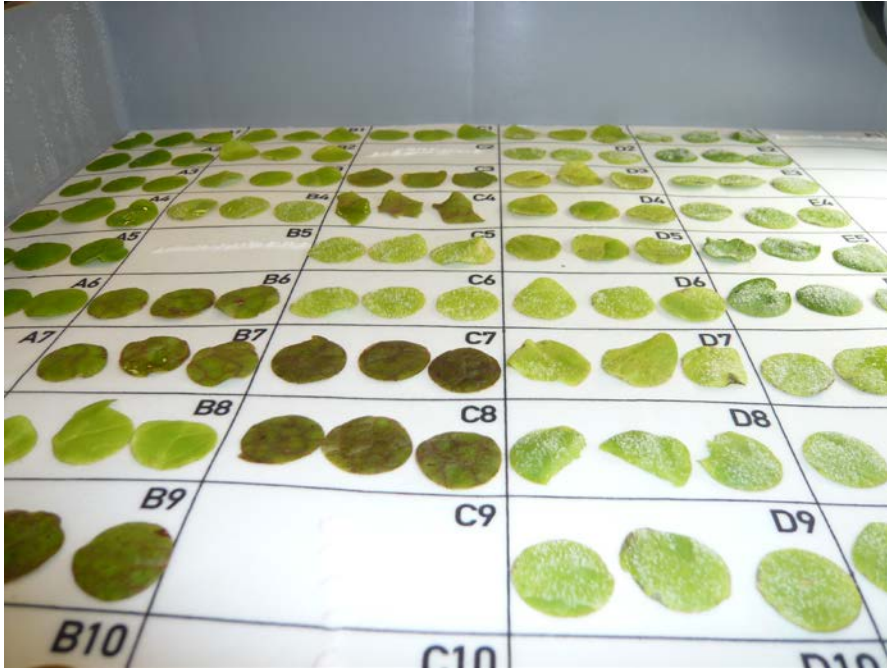


Fig. 5.1: Resistentietoets met bladponsen van sla.



Fig. 5.2: Virustoets op paprika-zaailingen

5.2 De omvang van de toets

Hoeveel planten gebruik ik voor deze toets? Een moeilijke vraag. Te weinig planten gebruiken geeft een onbetrouwbaar resultaat, te veel planten gebruiken kost teveel ruimte/geld. Men moet daarom de juiste afweging maken. Enkele zaken waarmee men rekening moet houden:

- De genetica van de resistentie. Gaat het om 1 of meerdere genen? Dominant of recessief?
- De genetica van het gewas. Is het een zelfbestuiver of een kruisbestuiver? Diploid of tetraploid?
- Zwart-wit verschil of kwantitatief verschil? Groot of een klein verschil? Hoe kleiner de verschillen zijn, hoe meer planten nodig zijn om deze verschillen te ontdekken.
- De verwachte variantie. Wanneer binnen een behandeling alle planten netjes precies hetzelfde reageren, heeft men minder planten nodig dan wanneer de verschillen tussen planten die hetzelfde behandeld zijn zeer groot zijn.

Men neemt in de toets al het materiaal dat men wil toetsen op resistentie mee. Ook erg belangrijk zijn de positieve en negatieve controle. Hiervoor kan men resp. een resistent en vatbaar ras gebruiken. Door steeds dezelfde rassen te gebruiken bij de toetsing met een bepaald pathogeen, kan men toetsen onderling vergelijken. Wanneer de vatbare controle nauwelijks ziek wordt, terwijl deze planten de vorige keer totaal ingestort zijn, kan men ervan uit gaan dat de inoculatie matig is verlopen. Wanneer ook de resistente controle ziek wordt is de proef ook niet optimaal verlopen. In dit geval was de dosis te hoog, of men heeft iets anders verkeerd gedaan, bijvoorbeeld het verkeerde fysio gebruikt.

5.3 De methode van inoculatie

Doel: Elke plant die men toetst moet zoveel mogelijk in dezelfde mate in contact gebracht worden met het pathogeen, zodat men eerlijk kan vergelijken. Bovendien wil men uitsplitsing in vatbare en resistente planten. Hiertoe moet men ervoor zorgen dat de mate van blootstelling voldoende is om alle planten te bereiken. Bij een te lage concentratie of onregelmatige verdeling van sporen over het materiaal zullen sommige planten bij toeval niet geïnfecteerd raken, en (wellicht ten onrechte) als resistent aangemerkt worden. Bij een te hoge concentratie zullen kwantitatieve verschillen in mate van aantasting niet duidelijk zijn, omdat het plantweefsel verzadigd is van inoculum. Men zoekt dus een dosis die zodanig is dat niet alle planten gezond blijven of alle planten sterven, maar een mooie uitsplitsing oplevert.

Bij het bepalen van de dosis, kan men twee dingen meten: de vitaliteit en de concentratie. De concentratie kan men meten met behulp van een telkamer. Dit is een speciaal stuk gereedschap waarin men een steeds gelijk volume vloeistof met daarin sporen kan aanbrengen. Wanneer men in dit vaste volume onder een microscoop het aantal sporen telt, kan men de concentratie berekenen. Als de sporen gekleurd zijn, kan men bij de telling onderscheid maken tussen levende en dode sporen.

Hieronder enkele voorbeelden van manieren waarop men de planten kan blootstellen aan het pathogeen:

- Injecteren of knippen met een in inoculumsuspensie gedoopte schaar (*Xanthomonas*)
- Met een besmet mesje in de bast snijden (*Nectria*)

- Een virus aanbrengen met carborundum en een sponsje. Men neemt een buffer. (Dit is een oplossing waarin de pH stabiel is, dit voorkomt dat het virus beschadigt.) Men voegt hieraan bladmateriaal van een zieke plant toe en wrijft dit fijn, bijvoorbeeld in een vijzel. Het carborundum-poeder brengt men als poedersuiker aan op de bladeren die men wil inwrijven met het sap. Vervolgens wrijft men met een sponsje dat gedoopt is in de buffer met virus over het blad. Het carborundum-poeder zorgt voor beschadiging van het blad. Hierdoor kan het virus de plant binnendringen.
- Een virus aanbrengen m.b.v. een insect. In sommige gevallen is dit nodig. Deze methode kost veel tijd en wordt daarom uitsluitend gebruikt wanneer mechanische besmetting (met carborundum + sponsje) niet mogelijk is.
- Een bepaald aantal insecten aanbrengen. Blad- of individuele-plant kooien helpen voorkomen dat het insect naar buurplanten vliegt.
- Dopen van de wortels in een sporensuspensie (*Fusarium*).
- Suspensie met sporen vernevelen/versproeien/verstuiven over de planten. Soms kan men het succes vergroten door wat suiker aan de suspensie toe te voegen.
- Besmette grond gebruiken of bijmengen (*Meloidogyne*)
- Potten met zieke planten naast elk veld of rijen met vatbare planten (“spreader rijen”) op het proefveld en deze besmetten. Dit is een optie wanneer het pathogeen polycyclisch is. De zieke planten op het veld, zorgen voor infectie van de planten die men wil toetsen.
- Niet inoculeren maar een reeds besmet perceel gebruiken of natuurlijke besmetting afwachten. Nadeel hiervan is dat de verspreiding van het pathogeen over het veld niet altijd homogoon en dicht genoeg is. Wanneer men natuurlijke besmetting afwacht, kan men de pech hebben dat het veld niet besmet raakt.
- Geen gebruik maken van het pathogeen zelf, maar de planten blootstellen aan de gifstof die het pathogeen eventueel produceert. Dit is maar bij relatief weinig pathogeensoorten aan de orde (necrotrofen, zie 1.3.1).

Wanneer men wil toetsen op resistentie tegen verschillende fysio's, kan men voor elk fysio een aparte toets uitvoeren. Men kan echter veel tijd en plaats uitsparen door te werken met één zuiver fysio of met een mengsel van fysio's.

1. Een toets met één fysio laat zien welk materiaal resistentie/vatbaar is voor dat fysio. Meestal kiest men het fysio dat het meest in de regio van de telers voorkomt. Of de eventuele resistentie ook effectief is tegen andere fysio's valt nog te bezien. Men kan met één fysio ook beoordelen of sommige planten kwantitatief resistent zijn tegen dat isolaat.
2. Een mengsel van fysio's. Als getoetst materiaal resistent is tegen het mengsel, is het kennelijk resistent tegen alle afzonderlijke fysio's in dat mengsel. Als een plant een verlaagd infectieniveau geeft tegen het mengsel, kan het zijn dat deze plant een kwantitatieve fysio-niet-specifieke resistentie heeft (tegen alle in het mengsel vertegenwoordigde fysio's) of dat het volledig vatbaar is voor sommige, en volledig resistent tegen de andere componenten in het mengsel (fysio-specifiek!)

5.4 De juiste omstandigheden voor ziekteontwikkeling creëren

Onder sommige omstandigheden lukt het bijna niet om planten ziek te krijgen. Voor boeren en tuinders is dit erg prettig, voor de veredelaar die een ziekte-toets wil voeren is dit soms een probleem. Onder andere de volgende omstandigheden kunnen de ziekteontwikkeling beïnvloeden:

- Luchtvochtigheid. Deze kan men soms verhogen door een tunnel over de planten heen te zetten of een watervernevelaar in het kascompartiment te zetten. In veldproeven is het belangrijk sporen op het juiste moment te verspreiden, bijvoorbeeld wanneer veel dauw verwacht wordt.
- De tijd van het jaar. Planten kunnen in de zomer te krachtig zijn en hierdoor weinig vatbaar voor een virus, terwijl de toets in het najaar prima verloopt.
- Temperatuur. Sommige pathogenen houden van koel weer, andere doen het beter tijdens een hittegolf.

6 Het beoordelen van de toets

Wanneer de genoemde stappen goed gelukt zijn en er bestaan binnen het getoetste materiaal verschillen in resistentie, heeft men nu een proef staan met daarin planten die waarschijnlijk in verschillende mate door het pathogeen worden aangetast. Nu is de vraag: hoe beoordelen we de resistentie van de planten? Hieronder enkele manieren om te meten in welke mate planten aangetast zijn. Het is aan de veredelaar om een slimme keuze te maken die voor zijn veredelingsdoel en zijn plant-pathogeen combinatie het meest geschikt is. Daarbij spelen argumenten mee als: Wil men selecteren op (waarschijnlijk) duurzame, maar kwantitatieve resistentie of op mogelijk niet-duurzame volledige resistentie? Hoe nauwkeurig wil men de scoring uitvoeren en hoeveel tijd mag dat kosten?

6.1 De componenten van resistentie

In bepaalde gevallen kan het interessant zijn om extra nauwkeurig waar te nemen om de verschillende componenten van resistentie te identificeren. Voorbeelden van verschillende componenten van resistentie zijn:

- Verminderd kans op succesvolle infectie
- Langere latentieperiode door een tragere ontwikkeling
- Minder grote aantallen sporen geproduceerd door elk sporenhoopje

Het kan zinvol zijn om te weten of resistenties gebaseerd zijn op 1 of op meerdere verschillende mechanismen. In het laatste geval kan men de verschillende resistenties eventueel stapelen. Dit kan leiden tot een hogere mate van resistentie of een duurzamere resistentie.

6.2 Severity: de mate van schade/necrose noteren

De “aantastingsgraad” van de plant noemt men in het Engels de **severity**. Men kan bijvoorbeeld noteren welk percentage van een blad of bladpompje bruin is geworden. Men kan ook het gemiddelde percentage aantasting van alle bladeren van de hele plant bepalen of schatten. Wanneer een pathogeen puistjes of vlekken veroorzaakt, kan men deze tellen en bijvoorbeeld het aantal hiervan per halm + bijbehorende bladeren bepalen.

Voor sommige pathogenen zijn schalen van aantastingsgraad ontwikkeld. Dit kan bijvoorbeeld een reeks foto's zijn van meer of minder aangetaste planten. Men kan de planten vergelijken met de foto's en er de juiste score aan hangen.

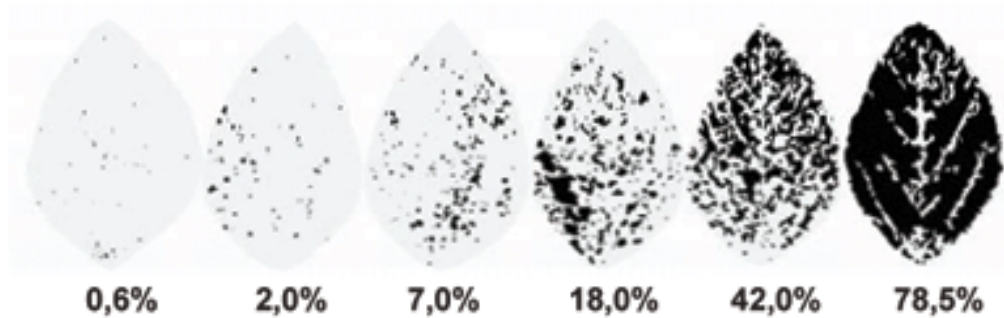


Fig. 7.1 “Severity scale” van roest op sojaboon.

Aan de hand van figuur 7.1 kan men het percentage van het blad dat bedekt is met sporenhoopjes snel inschatten. Soms werkt men ook met een index. In dat geval zou men de blaadjes i.p.v. van een percentage voorzien van bijvoorbeeld de namen “klasse 1” tot “klasse 6”.

6.3 De incidentie: planten verdelen in “ziek” of “gezond”

Wanneer men planten of ponsjes scoort op **ziek of gezond**, kan men het percentage aangetaste planten (of bladponsjes) bepalen. Let op: het gaat hier dus om het verdelen van meerdere planten in uitsluitend “ziek” of “gezond”, waarna men het percentage ziek kan bepalen. Dit noemt men de **incidentie**.

De praktijk: snel scoren of planten vatbaar of resistent zijn

Voor de veredelaar is het handig en snel als het verschil tussen vatbare en resistente types heel duidelijk is. Er kan dan snel gescoord worden. In de praktijk komt dit regelmatig voor. De methode is echter niet bruikbaar om een kwantitatieve verschillen in aantastingsgraad aan het licht te brengen. Toch kunnen dergelijke kwantitatieve verschillen wel degelijk interessant zijn (zie 2.3 en 2.4). Ze vergen dus nauwkeuriger manieren van waarnemen en scoren.

6.4 Tellen van het ziekte- of plaagorganisme

Bij roest kan men het aantal sporenhoopjes tellen. Bij een toets met insect zou men bijvoorbeeld het aantal insecten per plant op een bepaald tijdstip kunnen bepalen. In dit geval meet men dus niet in welke mate (in %) de plant is bedekt door pathoogeenkolonies, puistjes of vlekken, maar enkel hoeveel pathoogeen-eenheden te zien zijn per plant of blad(ponsje). Dit kan alleen bij relatief lage niveaus van aantasting, kost vrij veel tijd, maar levert een goede indruk of van kwantitatieve verschillen in aantasting.

6.5 Het ziekteverloop in de tijd: de latentieperiode

Hoeveel tijd zit er tussen het aanbrengen van het pathoogeen en het moment waarop men de aantasting op de plant ziet verschijnen? Wanneer de plant een bepaalde mate van afweer heeft tegen het pathoogeen, kan dit ervoor zorgen dat de aantasting meer tijd nodig heeft om zich te ontwikkelen. Dit kan om 2 redenen een nuttige vorm van resistentie zijn:

- Tragere aantasting kan ervoor zorgen dat de planten op het moment van oogst nog in een acceptabele staat zijn. Als de bladeren trager aangetast worden, kunnen ze bovendien langer een knol onder de grond blijven voeden.

- Tragere aantasting kan de verspreiding van de ziekte afremmen. Wanneer de schimmel er langer over doet om sporen te vormen op een plant, gaat de verspreiding door het veld veel trager. Dit principe is natuurlijk vooral van belang bij polycyclische pathogenen (zie 1.3.3).

De tijd die verstrijkt tussen het aanbrengen van het inoculum en het verschijnen van de aantasting noemt men Latentie periode (=periode waarin het pathogeen latent op of in de plant aanwezig is). Men bekijkt de geïnoculeerde planten dagelijks en telt de verschenen lesies of puistjes op elke plant, zodat het gemiddelde tijdstip van verschijnen van de aantasting uitgerekend kan worden. De latentie periode kan alleen in monocyclische tests (dus vooral in kas of klimaatkamer) worden bepaald. In het veld weet men nooit wanneer het inoculum is komen binnenwaaien, en er zijn in die situatie vele niet-synchroon begonnen infecties op de planten.

6.6 Het ziekteverloop in de tijd: de AUDPC

AUDPC staat voor Area Under the Disease Progress Curve. In fig. 7.2 ziet men een curve die het ziekteverloop in een bepaalde toets weergeeft. Wanneer men deze toets enkel op tijdstip 40 zou bekijken, zou men concluderen dat de mate van resistentie van ras A en ras B gelijk is. Er is echter wel degelijk verschil. Wanneer men op verschillende momenten een waarneming doet (bijvoorbeeld op tijdstip 10, 20, 30 en 40) kan men een grafiek als afgebeeld maken.

Vervolgens kan men voor elk ras de Area Under the Disease Progress Curve bepalen, d.w.z. het oppervlakte onder de grafiek. Hoe kleiner dit oppervlakte is, hoe resistenter het ras.

Deze methode gebruikt men vooral bij aantastingen in het veld door polycyclische pathogenen (zie 1.3.3.). Doordat dergelijke pathogenen zich in de beginfase vaak exponentieel vermeerderen ontstaan tot halverwege de epidemie toenemende verschillen in mate van aantasting tussen vatbare en partieel resistente planten/rassen/families (Zie figuur)

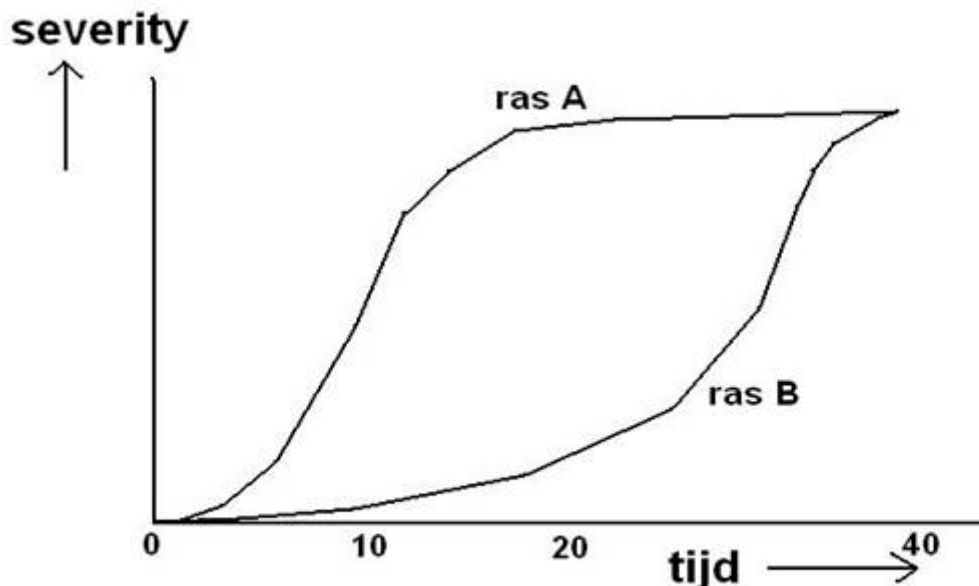


Fig. 7.2: Het ziekteverloop en het bepalen van de AUDPC

Dit kan gevolgen hebben voor de opbrengst. Ras A en ras B verliezen bijvoorbeeld beide 70% van hun bladoppervlak aan necrotische vlekken. Ras A heeft echter nauwelijks een knol kunnen vormen, terwijl ras B veel minder last zal hebben gehad van het verloren bladoppervlak. Ook kan het zo zijn dat ras A veel sneller/langer bron van inoculum is voor omliggende planten .

7 Problemen bij het beoordelen van proeven

Enkele problemen die men bij het beoordelen van proeven tegen kan komen zijn interplot-interferentie, ontsnappers en vroegheidsverschillen. In dit hoofdstuk bekijken we wat deze begrippen inhouden en welke maatregelen we hiertegen kunnen nemen.

7.1 Interplot interferentie

Interplot interferentie is de invloed die verschillende veldjes op elkaar hebben.

Bij een proef plaatst men op veldjes verschillende planten van de rassen dat men wil onderzoeken. Een veldje kan bijvoorbeeld 1x2 meter groot zijn en ingezaaid worden met het experimentele ras A. Hiernaast kan een veldje van 1x2 meter met daarop het experimentele ras B worden ingezaaid. Als deze veldjes elkaar beïnvloeden, noemt men dit interplot interferentie.

In paragraaf 1.3.3 hebben we gesproken van secundaire infecties. Dit zijn infecties die na de eerste infectie in het gewas nog ontstaan. Hierbij dienen zieke planten als bron van infectie. Een vatbaar ras, waarop de ziekteverwekker goed vermeerderd, zal veel meer sporen gaan verspreiden dan een tamelijk resistent ras. De “immigratie” van sporen uit het vatbare buurveldje zorgt ervoor dat het testveldje zwaarder wordt aangetast dan wanneer het veldje alleen door zijn eigen geproduceerde sporen zou worden aangetast. Dit effect verdoezelt dus verschillen in mate van resistentie tussen de rassen.

7.2 Ontsnappers

Een ander lastig verschijnsel waar men als veredelaar tegenaan loopt, zijn de ontsnappers. Dit zijn de planten die in de toets niet ziek worden, maar toch niet resistent zijn. Deze planten hebben “geluk gehad”. Er zijn bijvoorbeeld net wat minder (of geheel geen) sporen op deze planten gekomen, of men heeft de planten “te voorzichtig” met virus ingewreven.

Ontsnappers kunnen ten onrechte als “resistent” gescoord worden, en dat is ongewenst. Doordat ontsnappers willekeurig kunnen optreden, helpt het om, waar mogelijk, meerdere herhalingen in het experiment in te bouwen. De kans dat een object in elke herhaling bij toeval ontsnapt is natuurlijk klein. Wanneer men teveel ontsnappers aantreft, moet men de toetsmethode aanpassen. Bijvoorbeeld met een hogere concentratie sporen spuiten of de planten twee keer met virus in te wrijven.

7.3 Vroegheidsverschillen

Ook vroegheidsverschillen kunnen het beeld vertekenen. Wanneer een ras vroeg in het seizoen “klaar” is (= het oogstbare product is oogstrijp), heeft het minder te lijden van een aantasting aan het eind van het seizoen dan een laat ras.

Een groter aantal herhalingen kan de oplossing zijn voor de in dit hoofdstuk besproken problemen. Men toetst van elk ras bijvoorbeeld 12 plantjes in plaats van 1. Of men zaait van elk te testen ras 4 veldjes in i.p.v. slechts 1. Dit is echter niet altijd mogelijk in verband met

beperkte beschikbaarheid van materiaal. Bij klonaal vermeerderde gewassen (aardappel) of homozygote zelfbestuivers kan men makkelijk meer planten meenemen in een proef, in de F2 van een open-bestoven kruisbestuiver is dit echter niet mogelijk. (Dit komt doordat er hierbij niet voldoende (bijna-) identieke planten beschikbaar zijn voor de extra herhalingen.)

7.4 Het aanhouden van resistente planten

Wanneer men een resistentietoets heeft uitgevoerd, wil men vaak de resistente planten aanhouden om met dit materiaal verder te gaan. De planten zijn blootgesteld aan pathogeen en daarom een risico. Men verplaatst ze daarom meestal niet graag zomaar naar de “schone” moederplantenkas. Er bestaan enkele mogelijkheden om dit probleem op te lossen of te omzeilen.

1. In de toets geen complete plant, maar slechts een deel ervan gebruiken, dat men na afloop weg kan gooien. Dit gebeurt in een detached leaf toets. Men kan ook een groter deel gebruiken, zoals een hele tak. Soms kan men echter ook een stek maken, en zo een complete plant gebruiken voor de toetsing, terwijl de plant die de stek leverde onaangetast kan blijven voor toekomstig gebruik.
2. De reservezaad-methode. In dit geval zaait men een deel van het zaad uit voor een toetsing. De rest van het zaad bewaart men om eventueel mee verder te gaan. Of dit zinvol is, hangt natuurlijk af van de genetica van het materiaal waarmee men werkt.
3. Als de resistentie volledig is, zal de plant die in de toets als zodanig is gevonden geen besmettingsgevaar opleveren, omdat immers de resistentie het pathogeen heeft verhinderd zich te reproduceren.

8 Het opsporen en inkruisen van een resistentie

8.1 Op zoek naar een resistentie

Wanneer men een nieuw fyso van een schimmel of een nieuw pathotype van een bacterie ontdekt, gaat de veredelaar snel op zoek naar een bron van resistentie. De volgende stappen zou hij hierbij door kunnen lopen.

1. Als de veredelaar geluk heeft is (toevallig) een van zijn eigen rassen al resistent tegen het nieuwe fyso of pathotype. Daarom is het verstandig om niet alleen “exotische” bronnen te toetsen op resistentie, maar zeker ook dicht bij huis te kijken.
2. Vervolgens kan de veredelaar bekijken of een concurrent al een ras op de markt heeft gebracht dat resistent is. Wanneer dit het geval is, kan de veredelaar dit ras gebruiken als bron van resistentie. Groot voordeel hiervan is dat direct begonnen wordt met een kruising tussen twee marktwaardige rassen. Men hoeft dus weinig negatieve eigenschappen “uit te kruisen”. Vanaf de eerste kruising zullen de planten er goed uitzien. Dit leidt ertoe dat het aantal benodigde generaties om tot een goed ras te komen met de resistentie erin beperkt is. Dit bespaart veel tijd en geld.
3. Wanneer de gewenste resistentie nog niet aanwezig is bij de rassen die op de markt zijn, kan men nog kijken in oude rassen of in landrassen. Dit soort materiaal kan men bijvoorbeeld bestellen bij een genenbank en vervolgens screenen op resistentie. Wanneer men dit materiaal gebruik zal men echter veel negatieve eigenschappen tegenkomen. Men kruist met rassen die totaal niet meer aan de huidige eisen van de markt voldoen. Dit betekent dat er veel generaties nodig zijn om tot een acceptabel ras te komen.
4. Als ook in oude rassen geen effectieve resistentie tegen het nieuwe fyso wordt gevonden, kan men terugvallen op de wilde voorouders van het gewas. Wanneer men

deze als bron van resistentie gebruikt, zal men echter zeer veel ongewenste eigenschappen uit moeten kruisen voordat men een modern ras met het resistentiegen erin in handen heeft. Sommige bedrijven hebben een aparte afdeling pre-breeding die dit voorwerk uitvoert. De afdeling pre-breeding levert een halffabrikaat af dat zo goed mogelijk bruikbaar is voor de veredelaar. In sommige gevallen wordt tussen verdelingsbedrijven (en soms ook met DLO-instituten of Universiteit) samengewerkt om dergelijke halffabrikaten te ontwikkelen.

8.2 Terugkruisen

Wanneer men een bepaald gen uit een minder goed ras in een modern ras wil kruisen, maakt men gebruik van de techniek “herhaald terugkruisen”. Dit betekent dat men eerst het resistente ras met een modern ras kruist. Vervolgens selecteert men de resistente nakomelingen hieruit. Deze worden weer met het moderne ras gekruist. Ook hier selecteert men weer de resistente nakomelingen uit. Deze lijken al veel meer op een modern ras dan de vorige generatie. Op deze manier gaat men verder totdat men een ras heeft ontwikkeld dat wat betreft landbouwkundige eigenschappen in orde is en bovendien het nieuwe resistentiegen bezit. Vooral wanneer men meerdere resistentie-genen tegelijk wil inbouwen, is dit een hele klus. Als men ook op andere eigenschappen (bijvoorbeeld opbrengstpotentie) voortgang wil boeken, kan men ervoor kiezen om niet elke terugkruisingsronde met dezelfde ouder terug te kruisen, maar per ronde met een andere ouder die in andere aspecten uitblinkt terug te kruisen. Men is er meestal namelijk meestal niet in geïnteresseerd een resistent “tweelingbroertje” van het oorspronkelijke vatbare ras te ontwikkelen, maar veeleer een goed, modern nieuw ras, dat niet alleen resistent is, maar ook op in andere aspecten concurrerend is.

8.3 Koppeling

Het kan voorkomen dat resistenties gekoppeld zijn. In een positief geval betekent dit dat men twee resistenties in een keer inkruist. In een negatief geval kan dit echter betekenen dat een resistentie verdwijnt wanneer men een andere inkruist. Bij zelfbestuivers is dit een vervelend probleem. Bij hybride-rassen is dit makkelijk op te lossen: de ene resistentie kruist men in de vader inteeltlijn, de andere in de moeder inteeltlijn. In de hybride bevinden zich nu beide resistenties.

9 Merker gestuurde resistentieveredeling

Merkers zijn een handig hulpmiddel om vlotter resistenties in te kruisen. Met merkers bedoelt men stukjes DNA die aanwezig zijn naast een gen voor een nuttige eigenschap, bijvoorbeeld een resistentiegen. Een plant die de merker bezit zal dus in principe ook resistent zijn. Om toetsen met merkers te ontwikkelen, beschikken de meeste verdelingsbedrijven over een afdeling moleculaire biologie. Deze afdeling is er met name in gespecialiseerd om bij een bepaalde resistentie het juiste stukje DNA te vinden. Vervolgens ontwikkelt men een protocol om dit stukje DNA te kopiëren. Volgens dit protocol behandelt men monsters van de verschillende planten die men wil onderzoeken. Wanneer er een product (gekopieerd DNA) ontstaat, is het stukje DNA, en dus het resistentiegen aanwezig.

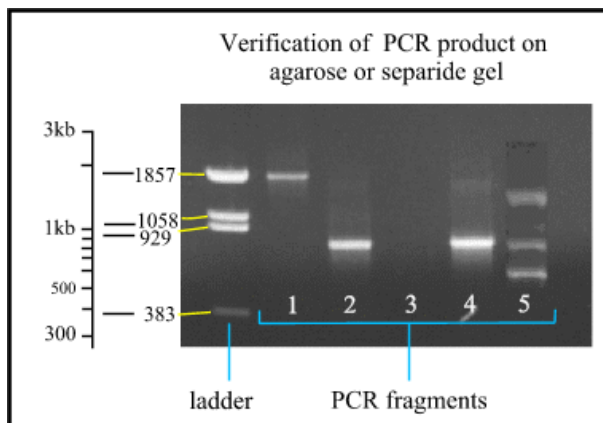


Fig. 10.1: PCR-product op een gel

Op deze afbeelding zien we een gel. Vaak maakt men gebruik van een gel om te bekijken of er product is ontstaan in een PCR. In “laantje” 2 en 4 ziet men duidelijk een “bandje”. De planten die horen bij deze baantjes bevatten kennelijk het gen dat men wilde aantonen.

Voor een PCR-toets is slechts een zeer kleine hoeveelheid plantmateriaal nodig. Men kan daarom reeds in een zeer vroeg stadium (wanneer een plantje nog heel klein is) toetsen op een groot aantal resistenties, mits voor die resistenties zo'n merker bekend is. Voor elke nieuwe resistentie en bron van resistentie moet opnieuw geïnvesteerd worden in merkerontwikkeling. De toepassing van selectie op grond van moleculaire merkers maakt ziekte-toetsen minder noodzakelijk. Echter, in de fase van ontwikkeling van de merkers moet men wel degelijk ziekte-toetsen toepassen om de associatie van resistentie met een bepaalde merker aan te tonen. Ook dient men aan het einde na te gaan of de resistentie werkelijk ingekruist is. Omdat men meestal een stukje DNA aantoot dat vlak naast de resistentie ligt, komt het soms voor dat de merker wel aanwezig is, maar de resistentie niet.

Het ontwikkelen van een PCR voor een resistentiegen veel geld. De investering heeft enkel nut voor dit ene specifieke resistentiegen. Wanneer men met een ander resistentiegen aan de slag gaat, moet men dus geheel opnieuw beginnen. Het ontwikkelen van een toets kost duizenden Euro's, een toetsing kost per monster per eigenschap op het moment ongeveer 1-2 Euro. Deze kosten worden echter steeds lager.

10 Transgene resistentie

Soms is het mogelijk om transgeen (d.w.z. door middel van genetische modificatie) een resistentie te creëren. In dit hoofdstuk noemen we kort enkele mogelijkheden.

10.1 Bt-mais en -katoen

In mais en katoen heeft men rassen ontwikkeld die een gen uit de bacterie *Bacillus thuringiensis* bevatten. *Bacillus thuringiensis* is een gram-positieve bodembacterie. De bacterie produceert een eiwit dat de vraatzucht van insecten snel doet stoppen en tevens dodelijk is. Dit gen heeft men ingebouwd in mais- en katoenrassen en zorgt voor resistentie tegen verschillende insecten, zoals de maisboorder. Rassen met dit gen worden in de praktijk al op grote schaal verbouwd.

10.2 Virusresistentie door inbouwen van het virus-RNA

Een manier waarop men planten soms resistent kan maken tegen een virus, is het inbouwen van erfelijk materiaal van het virus in de plant. De plant gaat in dit geval zelf flinke hoeveelheden virus-RNA produceren. Wanneer een stuk RNA in zeer grote hoeveelheden in

de plantencel aanwezig is, ontwikkelt de plant een soort “afweerreactie” tegen het RNA. Het RNA functioneert hierdoor niet meer naar behoren. Dit zorgt ervoor dat het virus niet meer in staat is om zich te verspreiden. Men noemt dit verschijnsel “gene silencing”. Gene silencing is een interessant onderwerp waarnaar op het moment nog veel onderzoek wordt gedaan. Resistentie tegen virussen op deze manier lijkt praktisch bruikbaar te zijn.

10.3 Andere mogelijkheden tot transgene resistentie

Er bestaan nog allerlei andere mogelijkheden tot transgene resistentie. Men kan hierbij denken aan het kunstmatig inbrengen van een gen voor een overgevoelheidsreactie. Dit kost echter veel tijd en moeite, terwijl de resistentie mogelijk vlot wordt doorbroken. In dit geval is inkruisen daarom efficiënter.

Ook kan men genen voor bepaalde enzymen die schimmels afbreken inbouwen. Dit heeft men bijvoorbeeld gedaan met het gen voor chitinase. Chitinase is een enzym dat chitine, een onderdeel van veel schimmels, afbreekt. Deze benaderingen kunnen werken, maar worden voor zover bekend enkel op experimentele schaal toegepast.

11 Bronvermelding/meer lezen

Diktaat Resistentieveredeling (06303804) R.E. Niks en W.H. Lindhout, 1997
Basiscursus plantenveredeling I J.E. Parlevliet, 1993
Plant Pathology, G.N. Agrios, 1997
Principles of plant genetics and breeding, Acquaah, 2007
Websites van veredelingsbedrijven zoals Enza Zaden, Rijk Zwaan en De Ruiter Seeds.

Dit dictaat kon mede tot stand komen dankzij de medewerking van Rients Niks (WUR) en Trinette van Selling (Enza Zaden). Veel dank voor het kritisch bekijken van de inhoud en het aanleveren van foto's uit de praktijk van de resistentieveredeling!

Principles of plant genetics and breeding
