

Biotechnology for cocoa pod borer resistance in cocoa

Chaidamsari, T.

Op 28 juni 2005 promoveerde T. Chaidamsari aan de Wageningen Universiteit op het proefschrift getiteld 'Biotechnology for cocoa pod borer resistance in cocoa'. Promotor was Prof. Dr. E. Jacobsen (leerstoelgroep Plantenveredeling) en co-promotor was Dr. R.A. de Maagd (Plant Research International). Het onderzoek werd gefinancierd door KNAW en is uitgevoerd bij Plant Research International en het 'Biotechnology Research Institute for Estate Crops' te Bogor, Indonesië.

Inleiding

De cacaoboem (*Theobroma cacao* L.) maakt de bonen waaruit cacao, de basis voor chocoladeproductie, wordt gemaakt (Figuur 1). *T. cacao* is een belangrijk gewas voor veel tropische landen in Zuid-Amerika, West-Afrika en Zuidoost Azië. Een aanzienlijk deel van de wereld cacao-productie kan verloren gaan door ziekten, veroorzaakt door schimmels en virussen, of door insectenplagen. In Indonesië, de tweede cacao-land van de wereld, maar ook in de rest van Zuidoost Azië, is de cacao podboorder (CPB, *Conopomorpha cramerella*) de belangrijkste insectenplaag. De larven van deze kleine mot (Figuur 2) boren door de wand van de vrucht (pod), voeden zich met de inhoud en verstoren de ontwikkeling van de bonen, leidend tot wel 80% productieverlies. Er is geen enkelvoudige effectieve manier om CPB te bestrijden en de voortschrijdende invasie van plantages brengt de toekomst van de productie van cacao in Indonesië in gevaar.

Het proefschrift beschrijft de eerste stappen op het pad van een biotechnologische benadering van CPB bestrijding door de productie van transgene, resistente cacaobomen, die een insectendodend eiwit van *Bacillus thuringiensis* (Bt) in de vruchtwand aanmaken. In het proefschrift wordt een overzicht ge-

geven van de herkomst en botanische eigenschappen van cacao, van de chocoladeproductie en van de vele ziekten en plagen die de cacao-productie wereldwijd bedreigen. Tevens beschrijft het de aard en langdurig veilig gebruik in de landbouw van de insectendodende activiteit van *Bacillus thuringiensis* en zijn eiwitten, hoe die eiwitten werken en hoe ze momenteel in transgene gewassen worden toegepast.

Bt toxinen

Bt toxinen vormen een grote familie van eiwitten, waarbij elk eiwit

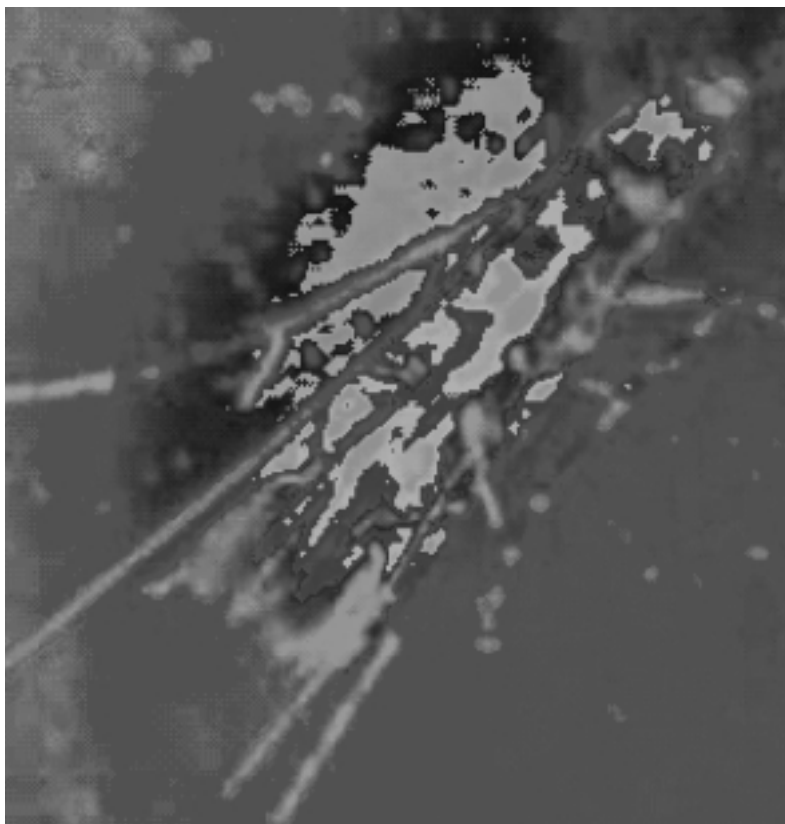
slechts actief is tegen een of enkele insectensoorten. Om die reden moesten eerst eiwitten met activiteit tegen CPB larven worden geselecteerd. In het proefschrift wordt de selectie beschreven van eiwitten met activiteit tegen CPB larven uit een verzameling van twaalf Bt toxines. Van de twaalf Bt toxinen (Cry eiwitten) die getest werden, bleken er vijf actiever dan de anderen. De activiteit van drie van deze vijf werd meer nauwkeurig bepaald. Daar alle drie hoge activiteit hadden én ze aanzienlijk in aminozuurvolgorde verschilden, is er goede hoop voor duurzame bestrijding van CPB met behulp van genen die voor deze toxinen coderen. Een van deze actieve eiwitten, genaamd SN19, werd gebruikt voor het verdere onderzoek.

De genen die coderen voor Bt toxinen zijn van bacteriële oorsprong en moeten daarom gewoonlijk veranderingen in het coderende gedeelte ondergaan om voldoende



Figuur 1. Bloem van de cacaoboem.

PROMOTIE



Figuur 2. Volwassen mot van de cacaoboorder.

hoog tot expressie te komen in transgene planten. Het aanbrengen van zulke veranderingen in het gen voor SN19 om de expressie te verhogen wordt in detail beschreven. De effecten van een aantal veranderingen werden getest en vergeleken met een oudere versie van het gen, welke volledig synthetische delen bevat. Omdat het zo lang duurt om vruchten van transgene cacao te krijgen, werden transgene *Arabidopsis thaliana* (zandraket) planten gebruikt als modelplant voor het testen van nieuwe genconstructen, in een combinatie met een 'groene delenspecifieke' promotor uit chrysant. Het aantal mogelijke 'doelwitplagen' van SN19 werd verder uitgebreid met *Pieris rapae* (klein koolwitje) en *Plutella xylostella* (koolmotje), plagen van kruisbloemige gewassen. De veranderingen in het gen van SN19 leverden een aanmerkelijke verbetering in de expressie en insectenresistentie op, maar haalden nog niet het niveau van de eerder gebruikte versie van het SN19 gen.

Expressie transgen

Weefsel- of orgaanspecifieke expressie van een transgen is alleen mogelijk indien deze gereguleerd wordt door een promotor die weefsel- of orgaanspecifieke activiteit vertoont. Teneinde een dergelijke vruchtwandspecifieke promotor voor expressie van een Bt toxinegen te verkrijgen, worden in het proefschrift twee benaderingen voor het isoleren van vruchtwand- of pulpspecifieke transcripten beschreven. 'Random' cDNA banken van de vruchtwand en van de pulp werden getest in een omgekeerde Northern blot om zo de hoogst tot expressie komende genen te identificeren. Vervolgens werd Northern blotting met RNA van verschillende weefsels en organen gebruikt om de specificiteit van die expressie te bepalen. Hoewel een aantal genen met hoge expressie in de vruchtwand of pulp werd geïdentificeerd, vertoonden vele daarvan ook expressie in bladeren en bonen. De tweede bena-

dering, het maken van een subtractiebank van vruchtwand cDNA-fragmenten met daaruit verwijderd het cDNA dat ook in bonen en bladeren voorkwam, leverde een aantal interessante, meer vruchtwandspecifieke cDNA's op. Een van deze, homo-log met een *Lea5* gen van katoen, kwam hoog tot expressie in de vruchtwand vanaf een vroeg ontwikkelingsstadium en werd daarom voor verder onderzoek en voor isolatie van zijn promotor geselecteerd. Vervolgens wordt beschreven hoe door 'genome walking' een fragment van het cacaogeenoom ter grootte van 3411 baseparen, met daarop het volledig cacao *Lea5* gen inclusief promotor, werd gekloneerd. De minimale actieve lengte van die promotor en de mate van regulatie werden bepaald door het transformeren van *Arabidopsis* met constructen waarin stukken van de promotor, met verschillende lengten, waren gefuseerd met het 'reporter' gen coderend voor GUS. Op deze manier werd bepaald dat de minimale lengte van de promotor, benodigd voor activiteit in *Arabidopsis* 451 baseparen (gerekend vanaf het startcodon) was. Echter, in *Arabidopsis* was de promotor ook actief in bladeren en wortels, wat erop wijst dat niet alle benodigde elementen voor vruchtwandspecifieke expressie aanwezig of actief waren in de *Arabidopsis* planten, en dat meer onderzoek nodig is. Het product van het cacaogeen, *TcLea5*, maakt deel uit van een familie van eiwitten (*Late embryogenesis associated* – geassocieerd met de laatste stadia van de embryogenese) welke gewoonlijk hoog tot expressie komen in uitdrogende embryo's, en soms in uitdrogende vegetatieve delen van de plant. Echter, er werd aangetoond, dat zowel in cacao als in tomaat het *Lea5* gen tot hoge expressie komt in de vruchtwand, waar de functie niet duidelijk is.

Transformatie en regeneratie

Voor de productie van transgene, insectenresistente cacaobomen is een effectief transformatie- en regeneratieprotocol nodig. Het proefschrift beschrijft de ontwikkeling, het testen en de vergelijking van een aantal protocollen, met verschillende weefsels, voor de productie van somatische embryo's, het uitgangsmateriaal voor transformatie en regeneratie. Somatische embryo's voortkomend uit zygotische embryo's of uit staminoden konden worden getransformeerd door *Agrobacterium tumefaciens* met een CaMV 35S promoter-*gfp* ('green fluorescent protein' – groen fluorescerend eiwit) construct, gevolgd door secundaire embryogenese en plantregeneratie. Volledig GFP-positieve plantjes werden verkregen uit somatische embryo's, die ontstaan waren uit zygotische embryo's. Dezelfde GFP-positieve plantjes zijn in ontwikkeling uit staminodeëxplantaten-geproduceerde somatische embryo's. De eerste resultaten van expressie van *SN19* onder controle van de CaMV 35S promoter in transgeen cacao callus laten

zien dat onze *SN19* constructen in staat zijn het gen in cacaoweefsels tot expressie te brengen.

Transcriptiefactoren in cacao

In het proefschrift wordt vervolgens een eerste karakterisatie beschreven van twee cacao genen die coderen voor transcriptiefactoren van de 'MADS-box' klasse en die waarschijnlijk betrokken zijn bij de regulatie van de bloeitijd en bij het bepalen van de bloembouw. Een cacao homoloog van het *Arabidopsis* gen *APETALA1* (*TcAPI*) kan betrokken zijn bij het meebepalen van het moment van vorming van de bloeiwijze, evenals bij het bepalen van de identiteit van de twee buitenste ringen van bloemorganen, de kelkbladen en de bloembladen. Als verwacht vanwege zijn voorspelde functie, en vergelijkbaar met de situatie in andere plantensoorten, kwam *TcAPI* alleen tot expressie in bloeiwijzen, en in de bloem vooral in kelk- en bloembladen, hoewel er ook expressie op een lager niveau in de andere bloemorganen werd gevonden. Een cacao homoloog van het

Arabidopsis gen *AGAMOUS* (*TcAG*) is waarschijnlijk betrokken bij het bepalen van de identiteit van de binnenste ringen van bloemorganen, de staminoden, de meeldraden en het vruchtbeginsel. Als verwacht vanwege zijn voorspelde functie en vergelijkbaar met de situatie in andere plantensoorten kwam *TcAG* alleen tot expressie in bloemen en daarin voornamelijk in staminoden, meeldraden en vruchtbeginsels. Ook werd aanhoudende expressie van *TcAG* in de vruchtwand gedurende de hele vruchtontwikkeling gevonden.

Conclusie en vooruitblik

Ondanks dat de voortgang in de cacaoveredeling langzaam is en de in gebruikneming van transgene gewassen in veel landen achterblijft, wordt vanwege het economische belang van cacao verwacht dat, volgend op een positieve balans van de geschatte risico's en verwachte voordelen, CPB-resistente transgene cacaobomen zullen worden geaccepteerd en grote invloed op het welzijn van veel Indonesiërs zullen hebben.

PROMOTIE