Ontwikkeling van een duurzame Phytophthora-resistentiestrategie in aardappel

Edwin van der Vossen, Ronald Hutten, Vivianne Vleeshouwers, Evert Jacobsen en Richard Visser

Wageningen UR, Plantenveredeling, Postbus 386, 6700 AJ Wageningen, email: edwin.vandervossen@wur.nl.

ARTIKEL

Resistentie

Net als mensen en dieren hebben planten afweermechanismen (resistentie) ontwikkeld om de constante druk van ziekteverwekkers (pathogenen) te overleven. Resistentie in planten lijkt opgebouwd uit meerdere lagen. In eerste instantie wordt het grootste deel van de potentiële ziekteverwekkers tegengehouden door constitutief aanwezige barrières bestaande uit fysieke obstakels (zoals celwanden) en de aanwezigheid van voorgevormde antimicrobiële afweerstoffen. Sommige pathogenen hebben zich echter zodanig gespecialiseerd dat ze deze primaire vormen van afweer (niet-waardplantresistentie) kunnen omzeilen. Voor dit type pathogeen heeft de plant een secundair resistentiemechanisme ontwikkeld, dat geïnduceerd wordt en gebaseerd is op herkenningsmechanismen (waardplantresistentie). Deze vorm van resistentie kan leiden tot een absolute vorm van resistentie die slechts werkzaam is tegen een beperkt aantal verschijningsvormen (isolaten of fysio's) van de ziekteverwekker, of tot een lager niveau van resistentie (partiële resistentie) die werkzaam is tegen alle fysio's. Een karakteristieke vorm van geïnduceerde resistentie is de overgevoeligheidsreactie (*hypersensitive response*, HR), die gekenmerkt wordt door de dood van een kleine groep cellen op de plaats van infectie. Gelijktijdig wordt er een cascade van afweerreacties in gang gezet, zowel lokaal, direct rond de plaats van infectie, alsook in andere delen van de plant. In geval van specifieke resistentie, die gebaseerd is op 'gen-om-gen'-interacties, zijn resistentiegenen (R-genen) in staat resistentie te bewerkstelligen via de herkenning van (specifieke) eiwitten van de ziekteverwekker, 'effectors' of avirulentie (AVR)-eiwitten genaamd. Partiële resistentie lijkt gebaseerd te zijn op de werking van meerdere onbekende genen of zwakke R-genen, die elk slechts een beperkt effect hebben op het resistentieniveau.

In geval van de aardappelteelt, wordt de meest ingrijpende ziekte (de aardappelziekte) veroorzaakt door de oömyceet *Phytophthora infestans*. Nederlandse telers beheersen de ziekte momenteel chemisch tegen hoge kosten in zowel economische zin als uit milieu-oogpunt. Omdat toekomstige beschikbaarheid van bestrijdingsmiddelen onder druk staat, heeft introductie van duurzame resistentie de hoogste prioriteit.

Historie van resistentieveredeling

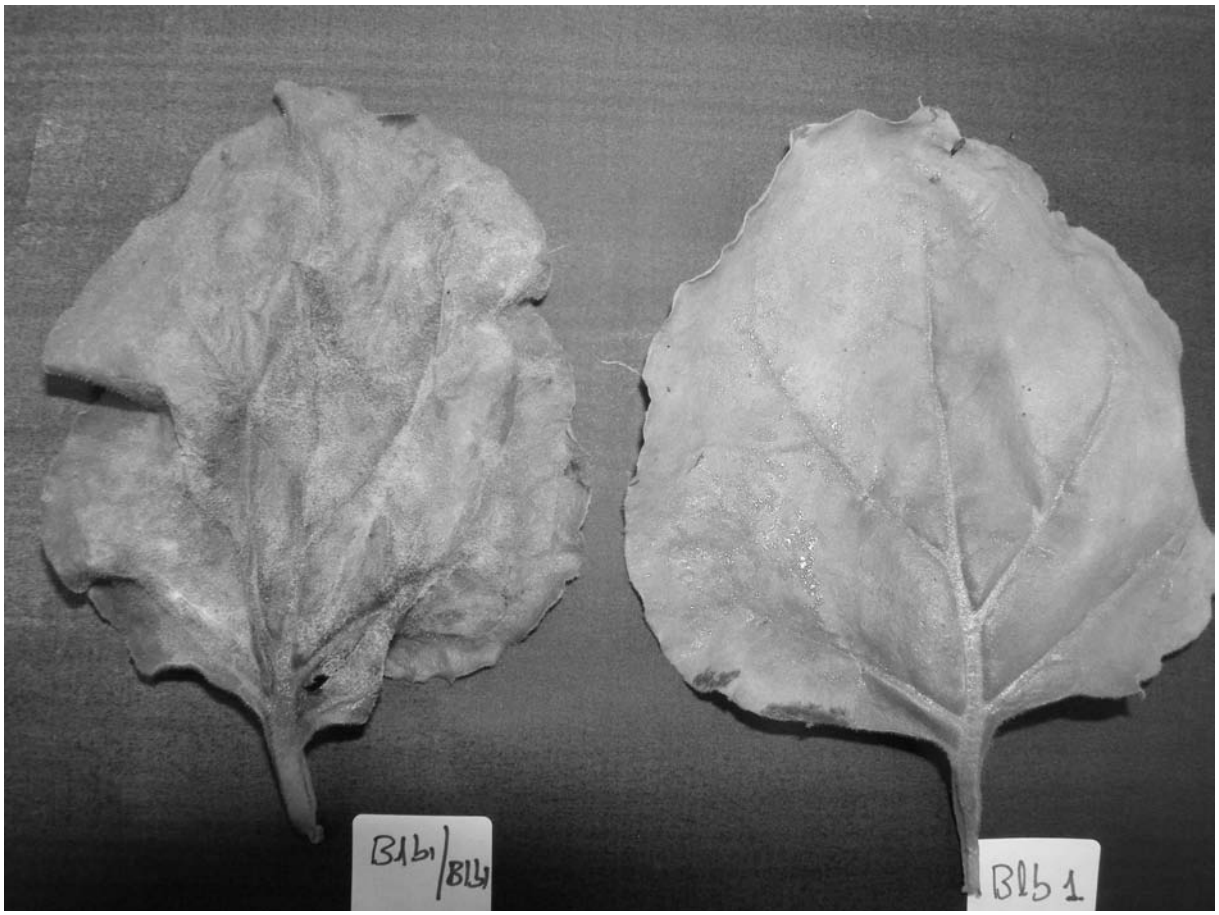
Resistentieveredeling met betrekking tot de aardappel (*Solanum tuberosum*) vindt zijn oorsprong in de eerste, en tegelijkertijd desastreuze, Phytophthoraproblemen in Noord Amerika en Europa in de periode 1843-1850. Slechts enkele van de vele geteelde landrassen overleefden deze uitbraak. Tezamen met een enkele nieuwe introductie (Rough Purple Chili) vormden deze landrassen de basis voor onze moderne rassen. Tot 1910 zijn er echter weinig aansprekende resultaten geboekt m.b.t. resistentieverdeling tegen *P. infestans*. De afgenomen agressiviteit van Phytophthora t.o.v. de periode 1845–1850 heeft waarschijnlijk een grotere rol gespeeld in de overleving van de aardappel als gewas in Europa dan deze eerste veredelingsactiviteiten. De ontdekking van monogene resistentie tegen wratziekte (*Synchytrium endobioticum*) en de herontdekking van de wetten van Mendel richtte het vizier van het aardappelresistentieonderzoek op de wilde aardappelsoorten van Zuid en Midden Amerika en speciaal op *Solanum demissum*. Dit gebeurde bij toeval, omdat deze soort, dan wel zijn hybriden, in Europese botanische tuinen aanwezig was en resistent bleek te zijn tegen Phytophthora. Een ander toeval was de relatief gemakkelijke kruisbaarheid van deze soort met onze cultuuraardappel. Het Duitse ras `Sandnudel´

ARTIKEL

Figuur 1. Voorbeeld van een 1:1 uitsplitsing van resistentie in een blaadjestoets van een F1-nakomelingschap, hetgeen een sterke aanwijzing is voor de aanwezigheid van een enkel R-gen.

(1934) was het eerste commerciële ras met een R-gen uit *S. demissum*. In diezelfde periode werd in Duitsland en Engeland de eerste doorbraak van de nieuwe resistentie waargenomen. Echter niet al het materiaal werd aangetast, en het werd duidelijk dat er in *S. demissum* meerdere resistentiegenen aanwezig waren. Tot en met de jaren vijftig bleef men het vertrouwen houden dat de combinatie van meerdere *S. demissum*-resistentiegenen dé oplossing tegen Phytophthora zou brengen. Het voorkomen van *Phytophthora*-isolaten met virulentiegenen tegen alle tot dan toe toegepaste/gevonden R-genen leidde echter in 1955 tot de totale neergang van de resistentieveredeling programma´s. Vanaf dat moment werd resistentie gebaseerd op R-genen niet meer beschouwd als een realistische oplossing van het probleem. Als er al mogelijkheden voor resistentieveredeling tegen Phytophthora waren zouden die gezocht moeten worden in de partiële, niet-fysio-specifieke, resistentie. Vijftig jaar van veredeling op partiële resistentie tegen Phytophthora heeft echter niet het succes gebracht dat in andere gewassen met dit type resistentie wel is geboekt. Onderzoek heeft weliswaar veel kleine QTL´s ('Quantitative trait loci'; kwantitatieve eigenschappen berustend op meerdere genen) opgeleverd maar deze zijn voor zowel de klassieke veredelaar als de moleculair geneticus, door de aard van het aardappelgewas (tetraploïd, kruisbestuiver, zeer heterozygoot), niet bruikbaar. Daarbij komt dat de QTL met het grootste effect m.b.t. partiële resistentie op chromosoom 5 ligt en zijn positie samenvalt met de positie van het hoofdgen dat de afrijping van het gewas bepaalt. Partiële resistentie blijkt gecorreleerd te zijn met een late afrijping, een correlatie die velen zonder succes hebben geprobeerd te doorbreken. Dit rechtvaardigt de conclusie dat het op chromosoom 5 gelegen hoofdgen, dat het tijdstip van afrijping bepaalt, een invloed op Phytophthora-resistentie heeft die onlosmakelijk verbonden is met de groeidynamiek van het genotype.

De tetraploïde en heterozygote aard van onze aardappelrassen, gecombineerd met de grote hoeveelheid eigenschappen waarmee rekening gehouden moet worden in het veredelingsprogramma, maakt het voor veredelaars bijna onmogelijk om meer dan 2 à 3 genen voor dezelfde eigenschap te stapelen. De, grotendeels op afrijping gebaseerde, in het rassenpakket voorkomende, verschillen in partiële resistentie tegen Phytophthora bieden geen enkel vooruitzicht op een duurzame teelt zonder gebruik van grote hoeveelheden gewasbeschermingsmiddelen. De bestaande verschillen bieden slechts mogelijkheden tot het spuiten met verlaagde doseringen en/of een spuitregime met grotere tijdintervallen. Kortom voor de veredelaars is het duidelijk dat de enige mogelijkheid voor resistentieveredeling ligt in het gebruik van absolute, fysio-specifieke, resistentiegenen of partiële resistentiegenen met een groot effect (hoofdgenen). Gelukkig heeft niet iedereen zich bij de klaarblijkelijke nederlaag van de R-gen gebaseerde resistentie veredelingsprogramma´s neergelegd. In de zestiger jaren startte het toenmalige Instituut voor Plantenveredeling (IVP) een introgressieveredelingsprogramma met *S. bulbocastanum*. Phytophthoraresistentie uit deze soort werd middels een ingenieus brugkruisingsschema met de soorten *S. aucale* en *S. phureja* in de *S. tuberosum* genenvoorraad ingebouwd. Uit dit programma bereiken de eerste rassen momenteel de markt. Ook R-genen uit bijvoorbeeld *S. berthaultii* en *S. microdontum* zijn in veredelingsprogramma´s van diverse kweekbedrijven ver opgewerkt en de verwachting is dat dit materiaal binnen afzienbare tijd goede Phytophthora-resistente rassen gaat opleveren. Het succes van



Figuur 2. Voorbeeld van lokale expressie van kandidaat AVR-genen in een Solanum-blad via Agro-infectie. De overgevoeligeidsreactie bij de onderste twee prikjes wijst op een mogelijke R-AVR-interactie.

deze nieuwe generatie rassen is natuurlijk sterk afhankelijk van de snelheid en mate waarin de *Phytophthora*-populatie virulentie tegen deze genen, of combinatie van genen, zal ontwikkelen. Dat dit vroeg of laat zal gebeuren wordt nauwelijks betwijfeld. Er zullen dan ook beheersstrategieën ontwikkeld moeten worden op basis van de kennis omtrent virulentie, fitness en epidemiologie van de aanwezige *Phytophthora*-isolaten, de R-genen aanwezig in de te telen aardappelrassen en de beschikbare bestrijdingsmiddelen om de verkregen resistenties waardevol te laten blijven. Een aantal feiten m.b.t. deze materie stemt ons hoopvol om te verwachten dat dit geen utopie is. Hoewel de elf gedefinieerde R-genen uit *S. demissum* allemaal doorbroken zijn en er isolaten bestaan die virulentie tegen al deze elf R-genen bezitten zijn er voorbeelden te vinden van situaties waarin deze genen toch inzetbaar zijn in de strijd tegen Phytophthora. Zo verschijnt de ziekte in Frankrijk systematisch later op rassen die het R2-gen bezitten en kan het ras Escort, dat minstens vijf R-genen bezit, in de meeste jaren, zonder al te grote Phytophthora-problemen biologisch geteeld worden. Ook nieuwere, uit *S. demissum* afkomstige, resistenties waarover de meningen verdeeld zijn of het fysio-specifieke R-genen dan wel niet-fysio-specifieke hoofdgenen betreft, blijkt in Mexicaanse en Hongaarse kweekprogramma´s gedurende een reeks van decennia goed te voldoen, getuige de resistentie van rassen als o.a. Nortena en Sarpo Mira.

Nieuwe bronnen van resistentie

Vanuit het Laboratorium voor Plantenveredeling, financieel ondersteund door initiatieven zoals het Centre for Biosystems Genomics (CBSG) en het Phytophthora ParapluPlan, is een systematische evaluatie van resistentie tegen Phytophthora in knoldragende wilde *Solanum*-soorten opgestart. In totaal werden 5000 genotypen, verdeeld over 1000 accessies van 200 verschillende knoldragende *Solanum*-soorten, *in vitro* op resistentie getoetst. In niet minder dan 166 *Solanum*-soorten werd enige vorm van resistentie gevonden. Gebruikmakend van kennis m.b.t. soortindeling en geografische herkomst van de *Solanum*-soorten werd een selectie gemaakt van 1200 genotypen

ARTIKEL

welke d.m.v. blad-, en veldtoetsen uitgebreid met meerdere isolaten werden getoetst. Genotypen met een duidelijke resistentiereactie tegenover meerdere isolaten werden gekruist met vatbare genotypen om populaties te verkrijgen waaraan genetische studies kunnen worden gedaan teneinde de overerving van de betreffende resistentie(s) te achterhalen (Figuur 1). Het moge duidelijk zijn dat men hierbij met name geïnteresseerd is in het vinden van hoofdgenen. Tot nu toe zijn op deze wijze in 16 *Solanum*-soorten aanwijzingen gevonden dat resistentie het gevolg is van een R-gen. Van nog eens 15 soorten bleef het gehele nakomelingschap onverminderd resistent, hetgeen ook een sterke aanwijzing voor de aanwezigheid van R-genen is. De verwachting is dat binnen dit onderzoek het aantal soorten waarin R-genen aangetoond worden nog aanzienlijk uitgebreid zal worden. Verdere analyse m.b.t. identiteit, werking en specificiteit van deze genen zal ons duidelijk maken met hoeveel genen veredelaars potentieel aan de slag kunnen en welke combinaties van R-genen een grote kans op duurzame resistentie zullen geven.

Knolresistentie

De eerste uitbraak van Phytophthora (1843-1850) maakte niet alleen duidelijk dat binnen zeer korte tijd een akker met een groen en gezond aardappelgewas in een zwartgeblakerd slagveld kon veranderen, maar ook dat de aardappelknollen in de grond of in de bewaring gevoelig waren voor de ziekte en konden veranderen in een zwart-paarse slijmerige substantie. Aangetaste knollen geven niet alleen opbrengstverlies maar zijn in afvalhopen en als aardappelopslag belangrijke verspreidingshaarden voor de Phytophthora-epidemie. Daarom moeten afvalhopen worden opgeruimd of afgedekt en wordt aardappelopslag zoveel mogelijk bestreden. Verder probeert men er alles aan te doen om te voorkomen dat zieke knollen worden ingeschuurd. In de praktijk blijken deze maatregelen niet afdoende te werken en daarom is het wijs meer aandacht aan knolresistentie te schenken. Of knollen aangetast worden is afhankelijk van factoren als de plaats van de knollen in de rug, rooibeschadigingen, dikte van de schil maar vooral van resistentie van en in de knol. Knolresistentie, zowel kwantitatieve als kwalitatieve resistentie, is beperkt aanwezig in het huidige rassenassortiment. De genetica van deze knolresistentie is echter nauwelijks bestudeerd en zeker niet in relatie met de R-genen welke in het aardappelloof actief zijn. Slechts van 4 R-genen is de werking in de knol bekend. Twee R-genen, uit respectievelijk, *S. bulcocastanum* en *S. demissum*, (*Rpi-abpt* en *R3a*) werken enkel in het blad, terwijl twee andere genen uit *S. demissum* (*R1* en *R3b*) ook in de knol werkzaam zijn (Park, 2005). In meerdere onderzoeksprojecten wordt momenteel aan knolresistentie gewerkt. Hierin wordt zowel aandacht besteed aan de rol van *S. demissum*-R-genen als ook aan andere, nieuwe, in het blad werkzame R-genen. Tevens wordt de genetica onderzocht van het zeer hoge niveau van knolresistentie dat in sommige bestaande rassen is aangetroffen.

Klonering van R-genen

Om duurzame resistentiestrategieën te kunnen ontwikkelen door het bij elkaar brengen (stapelen) van meerdere R-genen, via klassieke veredeling of via Genetische Modificatie (GM) -technologieën, moet men beschikken over genoeg R-genen waarvan men de werking en het resistentiespectrum zo goed mogelijk kent. Alleen met deze kennis kunnen juist die R-genen gestapeld worden in bestaande rassen die de kans op duurzame resistentie tegen Phytophthora zo groot mogelijk maken. Daarvoor is het nodig een groot aantal R-genen uit verschillende *Solanum*-soorten te isoleren en te karakteriseren. Tot 2007 waren er in totaal 4 R-genen gekloneerd die werkzaam zijn tegen *P. infestans*: *R1* (Ballvora *et al.*, 2002) en *R3a* (Huang *et al.*, 2005) uit *S. demissum* en *Rpi-blb1* (van der Vossen *et al.*, 2003), *Rpi-blb2* (van der Vossen *et al.*, 2005) uit *S. bulbocastanum*. Allen behoren tot de zogenaamde NBS-LRR-klasse van R-genen. Dit zijn genen die een redelijke mate van homologie bezitten in bepaalde delen van het gen en wel de zogenaamde 'nucleotide binding site' (NBS) en een leucine-rijke *repeat* (LRR). Momenteel wordt gewerkt aan de klonering van additionele genen met complementaire resistentiespectra. Hiervoor worden de genetische posities van de te kloneren R-genen eerst nauwkeurig in kaart gebracht door het ontwikkelen van moleculaire merkers die genetisch sterk gekoppeld zijn aan de resistenties. Merkers die alleen in resistente planten voorkomen liggen vermoedelijk fysiek zeer dicht bij de R-genen en worden gebruikt om zgn. genomische BAC-banken van de resistente ouderplanten te screenen om zo delen van het aardappelgenoom te isoleren waarop de R-genen liggen. Van BAC-klonen die het genetische interval van een te kloneren R-gen overbruggen wordt de DNA-volgorde bepaald om kandidaat (NBS-LRR) -genen

Figuur 3. Voorbeeld van een VIGS-experiment uitgevoerd in transgene Nicotiana benthamiana-planten die het R-gen Rpi-blb1 hebben. In het linkerblad is m.b.v. VIGS de expressie van Rpi-blb1 uitgeschakeld en is het blad in tegenstelling tot het rechterblad vatbaar geworden voor P. infestans.

te identificeren. Vervolgens worden alle kandidaat-genen gesubkloneerd in een binaire vector en m.b.v. *Agrobacterium tumefaciens* getransformeerd naar een voor Phytophthora vatbaar aardappelras. Primaire transformanten die vervolgens resistent blijken tegen Phytophthora moeten dan getransformeerd zijn met een functioneel R-gen. Bovenstaande kloneringstrategie wordt ook wel de 'map-based' (kaartgestuurde) aanpak genoemd. Recent is op deze manier een derde gen uit *S. bulbocastanum* gekloneerd, het *Rpi-blb3* gen op chromosoom 4.

Hoe meer R-genen er geïdentificeerd en gekloneerd worden, hoe groter de kans dat nieuwe R-genen op vergelijkbare posities in het genoom liggen. Door gebruik te maken van bestaande positie- en sequentie-informatie van reeds gekloneerde R-genfamilies kunnen nieuwe R-genen vaker via een 'allele mining' strategie op snelle en efficiënte wijze gekloneerd worden. Daarbij wordt met behulp van locus- en genspecifieke primers getracht alle kandidaatgenen in een bepaalde regio via PCR te vermeerderen. Het mengsel van vermeerderde genen wordt direct gekloneerd in een binaire vector tussen reeds geteste R-genspecifieke promoter- en terminatorsequenties en middels een transiënt expressiesysteem in *Nicotiana benthamiana* getest op functionaliteit. Via deze strategie is recent een drietal genen gekloneerd: *Rpi-abpt* op chromosoom 4 door gebruik te maken van sequentie-informatie van het *Rpi-blb3*-gen, en *Rpi-oka1* en *Rpi-nrs1* uit *S. okadae* en *S. neorossii* door gebruik te maken van *Tm2*-sequentie-informatie afkomstig van tomaat. Verwacht wordt dat vele van de *S. demissum*-genen op deze manier op korte termijn gekloneerd kunnen worden gezien de recente ontdekking dat acht van de elf beschreven *Phytophthora*-R-genen uit *S. demissum* op chromosoom 11 liggen en vermoedelijk allelen zijn van *R3a* (Huang, 2005).

Effector-receptor onderzoek

Naast de R-genen in de plant zijn de zogenaamde 'effector'-genen uit *Phytophthora* bepalend voor de uitkomst van aardappel-Phytophthora-interacties. Tijdens de infectie scheidt *Phytophthora* honderden effectors uit in de plantencel die gebruikt worden om de infectie van de plant te bevorderen, bijvoorbeeld door afweerreacties van de plant te beïnvloeden, het metabolisme van de plant te manipuleren, of door celdood te remmen. Sommige effectors worden door R-eiwitten herkend/gesignaleerd wat leidt tot een afweerreactie die veelal gepaard gaat met een HR. Recent zijn vier oömyceet-AVR-genen gekloneerd: *AVR1b-1* uit *P. soyae, ATR13* en

ARTIKEL

ARTIKEL

ATR1^{NdWsB} uit *Hyaloperonospora parasitica* en *AVR3a* uit *P. infestans* (voor een overzicht zie Kamoun 2006). Deze vier AVR-genen blijken te beschikken over een geconserveerd motief, een zogenaamd RXLR-DEER-motief. Voor de rest hebben ze geen herkenbare overeenkomsten. Uit de volledige DNA-sequenties van de twee *Phytophthora*-soorten *P. sojae* en *P. ramorum* blijken deze soorten >300 RXLR-houdende eiwitten te bevatten die vermoedelijk uitgescheiden worden in de plantencel (Kamoun, 2006). De recente voltooiing van de *P. infestans*-genoomsequentie laat zien dat dit bij *P. infestans* ook het geval is (Govers en Meijer, 2007, in deze Gewasbescherming). Gebruikmakend van deze kennis heeft het lab van Kamoun (Ohio State University, USA) circa achttienduizend unieke cDNA-fragmenten van *P. infestans* gescreend op aanwezigheid van het RXLR motief en een zogenaamd signaalpeptide, wat ervoor zorgt dat de eiwitten uitgescheiden worden. Genen met beide motieven zijn gekloneerd in een zogenaamde binaire PVX-expressievector waardoor het relatief eenvoudig is om via agro-infecties deze set van kandidaat-AVR-eiwitten één voor één zeer lokaal tot expressie te brengen in *Solanum*-planten die vermoedelijk R-genen bevatten (Vleeshouwers *et al.*, 2006). Als de plant reageert met een HR is dit een aanwijzing dat we te maken hebben met een R-AVR-interactie (Figuur 2). Via deze techniek zijn recentelijk nieuwe R-AVR-combinaties ontdekt. Ook zijn via 'allele mining'-experimenten zeer geconserveerde functionele *Rpi-blb1*-allelen met dezelfde specificiteit als *Rpi-blb1* geïdentificeerd in o.a. *S. stoloniferum* en *S. papita*, soorten die onverwant zijn aan *S. bulbocastanum*. Dit suggereert

Figuur 4. Arabidopsis-mutant die vatbaar is voor P. infestans.

dat *Rpi-blb1* is ontstaan voor de differentiatie van deze soorten. In vergelijking met *S. bulbocastanum*, zijn *S. stoloniferum* en *S. papita* veel makkelijker te kruisen met *S. tuberosum*. Dit maakt dat de *Rpi-blb1*-specificiteit toegankelijker is geworden voor de klassieke introgressieveredeling. Via dit type onderzoek krijgen we een beter inzicht in de allelische variatie en evolutie van R- en AVR-loci, de sleutel tot een duurzame inzet van R-genen tegen de aardappelziekte.

Resistentiemechanismen

Als eenmaal het arsenaal aan R-genen in *Solanum* bekend is zullen de nieuwe R-genen op de een of andere manier beoordeeld en/of geclassificeerd moeten worden, liefst op basis van duurzaamheid-voorspellende parameters. Parameters die van belang kunnen zijn en waarop de genen geclassificeerd kunnen worden zijn: de wilde soort waaruit ze afkomstig zijn, hun genetische positie, de sequentie, het resistentiespectrum, de effectorherkenning en het werkingsmechanisme. Om inzicht te krijgen in het laatste wordt onderzoek gedaan naar de moleculaire werkingsmechanismen van verschillende resistentietypen. Histologisch onderzoek heeft uitgewezen dat bij zowel niet-waardplantresistentie als waardplantresistentie een HR optreedt, zij het op verschillende schaal. Om uit te zoeken in hoeverre daar verschillende moleculaire mechanismen bij betrokken zijn is via 'microarray'-analyses gekeken naar transcriptionele veranderingen in de plant gedurende de eerste 72 uren van verschillende (compatibele en incompatibele) interacties tussen *Solanum* en *P. infestans*. Daarvoor is een afweer-gerelateerde cDNA-microarray gegenereerd met ca. 4000 cDNA-fragmenten van aardappelgenen die enige homologie vertonen met genen die in andere ziekteverwekkende systemen geclassificeerd zijn als afweer-gerelateerd. Vergeleken zijn genexpressieprofielen in vier verschillende resistentie-achtergronden: *S. nigrum* (niet-waardplantresistentie), *S. microdontum* (partiële waardplantresistentie), en twee *S. tuberosum*-achtergronden met

Rpi-blb1 of *R3a*. Grote, tijdgerelateerde transcriptionele, veranderingen werden waargenomen zowel binnen als tussen de onderzochte resistentie-achtergronden. Om te onderzoeken in hoeverre dit sleutelgenen betreft van verschillende afweermechanismen, is een twintigtal genen geselecteerd voor verdere functionele analyses via transiënte overexpressie en uitschakeling (ook wel *silencing* genaamd en uitgevoerd met behulp van een virus; *virus induced gene silencing*, VIGS) -studies. Ook wordt m.b.v. VIGS de rol van een twintigtal bekende sleutel-afweergenen, zoals *NPR1, NDR1, EDS1, RAR1, SGT1* en diverse transcriptiefactoren en kinases, bij afweer tegen Phytophthora onderzocht (Figuur 3). Deze proeven wijzen uit dat R-genen tegen *P. infestans* inderdaad verschillende werkingsmechanismen kunnen hanteren. Toekomstige proeven op een grotere set van R-genen moeten uitwijzen hoeveel verschillende werkingsmechanismen er te onderscheiden zijn en of het stapelen van R-genen onder andere op basis van een verschillend werkingsmechanisme resistentie kan verhogen en/of verduurzamen.

Niet-waardplantresistentie

Niet-waardplantresistentie omvat meerdere lagen/niveaus van afweer. Enerzijds worden induceerbare afweerreacties geactiveerd door niet-variabele moleculen of effectors die geconserveerd zijn in hele klassen van ziekteverwekkers, zogenaamde 'pathogen associated molecular patterns' (PAMPS). PAMP-herkenning door specifieke receptoren in de plant leidt tot aanschakelen (activering) van diverse afweer-gerelateerde mechanismen. Ziekteverwekkers die zich gespecialiseerd hebben op bepaalde plantensoorten en deze planten dus kunnen koloniseren, omzeilen deze resistentie door specifieke effectoren de plant in te spuiten die activering van de basale afweer blokkeren. Anderzijds spelen bestaande en/of induceerbare fysische en chemische barrières een rol. Recent zijn in de modelplant *Arabidopsis thaliana* een drietal zogenaamde penetratiemutanten geïdentificeerd (*pen1-3*) waarin de penetratieweerstand van de celwand verminderd is (Stein *et al*., 2006). Diverse ziekteverwekkers die normaal gesproken de buitenste cellagen van een *Arabidopsis*-blad niet kunnen binnendringen kunnen dat bij deze mutanten wel. In geval van *pen2* en *pen3* is ook *P. infestans* beter in staat de buitenste cellagen van het blad binnen te dringen. Echter, eenmaal in de plantencel wordt *P. infestans* in deze mutanten alsnog tegengehouden door activering van een afweerreactie die gepaard gaat met een HR. Onbekend is uit hoeveel lagen de niet-waardplantresistentie in *Arabidopsis* tegen *P. infestans* is opgebouwd. Een antwoord hierop kan alleen gegeven worden door het genereren en karakteriseren van meer mutanten die gestoord zijn in hun afweer tegen *P. infestans*. Daarom zijn in een verzameling van ca. 10.000 *Arabidopsis*-mutanten die verspreid over het genoom verschillende deleties bevatten, mutanten opgespoord die een zeldzame vatbaarheid vertonen voor *P. infestans* (Figuur 4). Voor mutanten met de meest duidelijke vatbare fenotypen zijn F2-populaties ontwikkeld. Er wordt momenteel getracht bij twee mutanten de verantwoordelijke mutaties op te sporen via genetische kartering en *microarray*-hybridisatie-experimenten. Als eenmaal de verantwoordelijke mutaties geïdentificeerd zijn worden de wildtype allelen van de gemuteerde genen via GM-technieken teruggezet in de mutant. Genen die op deze manier het vatbare fenotype opheffen zijn betrokken bij de resistentie tegen *P. infestans*. Introductie van dit soort genen in de gecultiveerde aardappel moet uitwijzen of dit type resistentie een aanvulling dan wel een alternatief kan zijn voor toekomstige duurzame Phytophthoraresistentie in aardappelrassen.

Stapeling van R-genen en mengteelt

Om de kans op aanpassing aan de R-genen (adaptatie en dus virulentieontwikkeling) in de *P. infestans*-pathogeenpopulatie te verlagen, kan men proberen om meerdere genen met verschillende functies (resistentie-cassette) te combineren in één ras. Hiermee streeft men naar 1) verhoging van het resistentieniveau, 2) een verbreding van het resistentiespectrum en 3) een verhoging van de duurzaamheid. Introgressie van R-genen via soortkruisingen, gevolgd door terugkruisingen en selectie, al dan niet m.b.v. moleculaire merkers, is in principe de gangbare weg maar kost veel tijd. In de praktijk is gebleken dat vanuit de betrokken wilde soorten de R-genen in voldoende mate overgedragen kunnen worden, maar dat de laatste stap om tot een raswaardig product te komen moeilijk is. Waarschijnlijk wordt dit veroorzaakt door gebrek aan recombinatie van ongewenste eigenschappen die mogelijk aan de resistentie gekoppeld zijn. De afhankelijkheid van recombinatie in terugkruisingen tijdens het veredelen van een ras is bij een GM-benaderingswijze afwezig. Hierbij worden de gewenste genen eerst

ARTIKEL

ARTIKEL

moleculair geïsoleerd waardoor ze worden bevrijd uit hun negatieve genetische context. Daarbij is het ook mogelijk genconstructen te maken waarin gelijktijdig meerdere R-genen van verschillende herkomst gecombineerd worden. Deze genen kunnen ook gescheiden in verschillende klonen van hetzelfde ras gebracht worden en als mengras gebruikt worden. Het mengen van resistente rassen kan de epidemische verspreiding vertragen dan wel verhinderen op drie verschillende manieren: 1) de verschillende resistentiecomponenten in het mengsel vormen fysische barrières voor de verspreiding van inoculum, 2) het vermindert de vermeerdering van het pathogeen en daardoor de hoeveelheid inoculum in het veld, en 3) incompatibele 'gen-om-gen' interacties kunnen geïnduceerde resistenties tegen vervolginfecties met virulente stammen bewerkstelligen. Binnen het DuRPh-programma worden aardappelrassen via genetische modificatie voorzien van R-gencassettes met verschillende aantallen genen en combinaties van genen. Deze GM-rassen worden vervolgens gebruikt om het effect van R-genstapeling en mengrassen op de epidemiologie van Phytophthora-uitbraken in het veld te toetsen.

Toekomstperspectief

Ondanks het feit dat genomics onze inzichten in de interactie tussen aardappel en *P. infestans* al aanzienlijk heeft vergroot, hebben we vermoedelijk nog maar een tipje van de sluier opgelicht. Met de recente voltooiing van de *P. infestans*-genoomsequentie is binnenkort het complete arsenaal aan effectors bekend en kan het onderzoek zich gaan richten op hoe de variatie in deze genen virulentieontwikkeling beïnvloedt. Van groot belang daarbij is een efficiënte monitoring van virulentieontwikkeling gedurende het teeltseizoen en over meerdere jaren. CBSG-sequencing initiatieven gericht op de identificatie van R-gen-clusters, en het recent opgestarte 'Potato Genome Sequencing Consortium' (PGSC), beloven op korte termijn volledig inzicht te geven in de verdeling van R-gen-clusters in het aardappelgenoom. Dit zal de identificatie en klonering van nieuwe R-genen nog meer zal versnellen.

Het moge duidelijk zijn dat een slimme inzet en een goed management van R-genen de sleutel is tot een duurzame oplossing van het Phytophthoraprobleem. Naast de ontwikkeling van duurzaamheid-voorspellende parameters is een efficiënte introductie van deze genen van essentieel belang. Voorzien wordt dat efficiënte introductie van R-gencassettes met verschillende aantallen genen en combinaties van genen, slechts via GM-technieken mogelijk is, waarbij het concept *cisgenese* de maatschappelijke acceptatie van GM-aardappelrassen moet bevorderen (Jacobsen & Schouten, 2007). Daarbij worden alleen aardappeleigen-genen gebruikt die in principe ook via geëigende veredelingstechnieken geïntroduceerd kunnen worden, en zijn de gemodificeerde aardappelen ook vrij van merkers zoals antibioticum- of herbicide-resistentie. Dit moet niet alleen de acceptatiegraad aanmerkelijk verbeteren maar ook de monopoliepositie van de grote multinationals op het gebied van de toepassing van GM-technologie verkleinen.

Referenties

Ballvora, A., Ercolano, M.R., Weiss, J., Meksem, K., Bormann, C.A., Oberhagemann, P., Salamini, F. & Gebhardt, C., 2002. The R1 gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. The Plant Journal 30, 361-371.

Govers, F. & Meijer, H.J.G., 2007. *Phytophthora*-genomics: nieuwe mogelijkheden en uitdagingen. Gewasbescherming 38(5): 265-271.

Huang, S., 2005. Discovery and characterization of the major late blight resistance complex in potato: genomic structure, functional diversity, and implications. Thesis Wageningen University.

Huang, S., van der Vossen, E.A.G., Kuang, H., Vleeshouwers, V.G.A.A., Zhang, N., Borm, T.J.A., van Eck, H.J., Baker, B., Jacobsen, E. & Visser, R.G.F., 2005. Comparative genomics enabled the isolation of the *R3a* late blight resistance gene in potato. The Plant Journal 42, 251-261.

Jacobsen, E. & Schouten, H.J., 2007. Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants. Trends in Biotechnology 25, 219-223.

Kamoun, S., 2006. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. Annual Review of Phytopathology 44, 1-20.

Park, T.H., 2005. Identification, characterization and high-resolution mapping of resistance genes to *Phytophthora infestans*. Thesis.

Stein, M., Dittgen, J., Sanchez-Rodriguez, C., Hou, B.H., Molina, A., Schulze-Lefert, P., Lipkam V. & Somerville, S., 2006. Arabidopsis PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration. Plant Cell 18, 731-746.

van der Vossen, E., Sikkema, A., Hekkert, B.L., Gros, J., Stevens, P., Muskens, M., Wouters, D., Pereira, A., Stiekema, W. & Allefs, S., 2003. An ancient R gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. The Plant Journal 36, 867-882.

van der Vossen, E.A.G., Gros, J., Sikkema, A., Muskens, M., Wouters, D., Wolters, P., Pereira, A. & Allefs, S., 2005. The Rpi-blb2 gene from *Solanum bulbocastanum* is an Mi-1 gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato. The Plant Journal 44, 208-222.

Vleeshouwers, V.G.A.A., Driesprong, J.D., Kamphuis, L.G., Torto-Alalibo, T., van 't Slot, K.A.E., Govers, F., Visser, R.G.F., Jacobsen, E. & Kamoun, S., 2006. Agroinfection-based high throughput screening reveals specific recognition of INF elicitins in *Solanum*. Molecular Plant Pathology 7, 499-510.