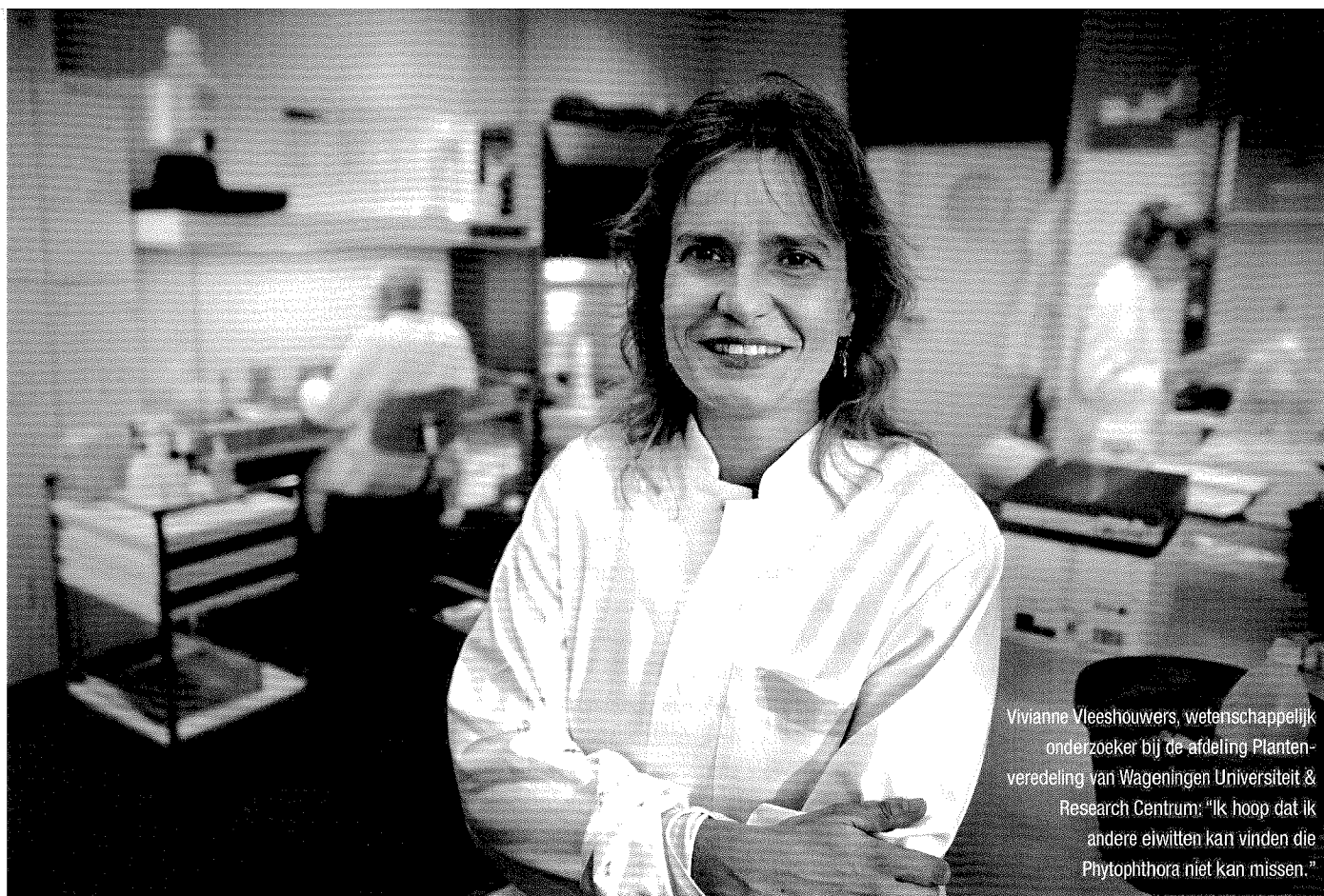




Vivianne Vleeshouwers, wetenschappelijk onderzoeker bij de afdeling Plantenveredeling van Wageningen Universiteit & Research Centrum: "Ik hoop dat ik andere eiwitten kan vinden die *Phytophthora* niet kan missen."

Wageningse doorbraak in aanpak aardappelziekte?

Labstrijd tegen phytophthora

Al tientallen jaren zoeken plantenveredelaars vergeefs naar aardappelrassen die resistent zijn tegen de aardappelziekte *Phytophthora*. De vernieuwende aanpak van de Wageningse onderzoeker Vivianne Vleeshouwers blijkt effectiever. De vraag is alleen of de gebruikte cisgenese technologie maatschappelijk geaccepteerd zal worden.

Auteur: Els van den Brink | Fotografie: Marco Vellinga

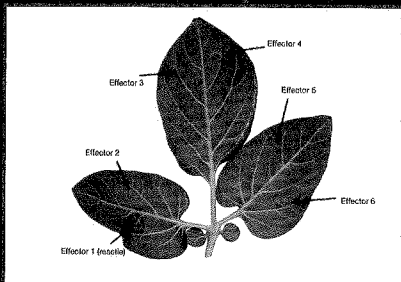
Wereldwijd hebben boeren veel last van de aardappelziekte *Phytophthora*. *Phytophthora infestans* is een oömyceet, een micro-organisme dat veel lijkt op een schimmel. Door de ziekte verrotten de knollen, terwijl bladeren en stengels bruin kleuren en afsterven. Aardappelen zijn zeer vatbaar voor deze ziekte. Boeren moeten veel bestrijdingsmiddelen gebruiken om de ziekte tegen te gaan. Biologische telers, die dit niet doen, hebben regelmatig een mislukte oogst. Al tientallen jaren proberen plantenveredelaars aardap-

pelrassen te ontwikkelen die resistent zijn tegen deze ziekte. Helaas vallen de resultaten tegen. Als er al een resistent ras wordt ontdekt, dan wordt de resistentie binnen enkele jaren weer doorbroken door een mutatie in *Phytophthora infestans*.

EFSA overtuigd

Vivianne Vleeshouwers, wetenschappelijk onderzoeker bij de afdeling Plantenveredeling van Wageningen Universiteit & Research Centrum, koos daarom voor een

fundamentelere aanpak. Ze besloot om eerst uit te zoeken hoe de resistentie van aardappelplanten werkt. "Ik richt me op de eiwitten die *Phytophthora* aanmaakt en probeer te begrijpen hoe deze eiwitten door de plant worden herkend. Met die kennis kun je resistentiegenen veel gericht inzetten", legt ze uit. De Europese Autoriteit voor Voedselveiligheid (EFSA) is al overtuigd en heeft de techniek onlangs even veilig verklaard als normale aardappelveredeling.



Een herkend effectoreiwit geeft bruinkleurig
waardoor een bladdeel afsterft en de ziekte zich
niet kan uitbreiden.

Reacties op effectoreiwitten

Bij een aardappelplant is op verschillende plaatsen bacteriekweek ingespoten met zes verschillende effectoreiwitten. De aardappelplant blijkt alleen bruinkleurig te vertonen bij effector 1. Dit betekent dat in deze plant een resistentiegen aanwezig is dat effector 1 herkent en geen resistentiegenen tegen de andere effectoreiwitten. Herkenning leidt namelijk tot een afweerreactie, waardoor de cellen rondom de infectie afsterven, en daarmee ook de binnengedrongen *Phytophthora*. Niet-herkende effectoreiwitten onderdrukken vaak dergelijke afweerreacties, waardoor er geen bruinkleurig optreedt. Hierdoor heeft de pathogeen de gelegenheid om zich door de hele plant te verspreiden, voordat de aardappelziekte tot uiting komt.

Effectoreiwitten

In het verleden waren al wel enkele genen geïdentificeerd als resistentiegenen, maar hun functioneren bleef een *black box*. *Phytophthora* blijkt tijdens de infectie honderden eiwitjes uit te scheiden. Het genoom van *Phytophthora infestans*, dat in 2009 volledig is opgehelderd, bevat meer dan vijfhonderd van dit soort effectorgenen. Daarbij zijn variaties tussen verschillende *Phytophthora*-varianten nog niet eens meegenomen. Vleeshouwers heeft enkele honderden effectoreiwitten geïdentificeerd en gekloneerd in de bacterie *Agrobacterium tumefaciens*. Wanneer ze het effect van een enkel effectoreiwit op een bepaalde aardappelplant wil onderzoeken, gebruikt ze een kweek van deze bacterie, waarin dit effectoreiwit tot expressie komt. Door deze kweek in een blad van een aardappelplant te spuiten, kan ze de interactie nauwkeurig onderzoeken (zie kader). "Dit is voor ons een heel belangrijke techniek. Nu kunnen we alles zuiver analyseren", stelt Vleeshouwers. Dankzij dergelijke experimenten ontdekte Vleeshouwers dat het effectoreiwitten zijn die worden herkend door resistentiegenen in de aardappelplant. Elk resistentiegen herkent weer een ander effectoreiwit. *Phytophthora* heeft in het verleden de effectiviteit van diverse resistentiegenen doorbroken door het betreffende effectoreiwit niet meer te gebruiken of te muteren.

Wilde aardappelvariëteiten

Dankzij deze informatie kan Vleeshouwers veel gericht zoeken naar nieuwe resistentiegenen. Hierbij maakt ze gebruik van een grote collectie aardappelplanten die ze de afgelopen jaren heeft verzameld. Ze haalde bijvoorbeeld een groot aantal wilde aardappelsoorten uit Zuid-Amerika en Mexico. De collectie bevat op dit moment meer dan vijfhonderd verschillende genotypen, afkomstig van ongeveer 120 verschillende soorten. "Het onderhouden van zo'n collec-

tie vergt veel werk. Omdat de aardappel een heterozygote plant is, kun je genotypen niet als zaad bewaren. Daarom houden we de plantjes in stand met weefselkweek", vertelt Vleeshouwers.

Om de planten te onderzoeken op hun vatbaarheid voor de aardappelziekte laten Vleeshouwers en haar collega's stekjes van deze collectie uitgroeien tot aardappelplanten van normale grootte. Zo ontdekten ze bijvoorbeeld dat meer dan vierhonderd van de wilde aardappelgenotypen uit de collectie enige vorm van resistentie bevatten. Door deze genotypen te kruisen met niet-resistente genotypen, kon Vleeshouwers genen identificeren die verantwoordelijk zijn voor deze resistentie. In totaal heeft zij samen met haar collega-onderzoekers al 23 resistentiegenen geïdentificeerd. De komende jaren hopen ze dit aantal nog verder uit te breiden.

Cisgenese

De nieuw ontdekte resistentiegenen kunnen door middel van genetische modificatie re-

latief snel in bekende aardappelrassen worden ingebouwd. De technologie maakt het mogelijk om een of meerdere genen in de aardappelplant in te bouwen, zonder dat daarbij ongewenste eigenschappen optreden, zoals bij de traditionele manier van veredeling vaak het geval is (zie kader 'Klassiek, cis- of trans?'). Dit gebeurt merkervrij. Er zijn dus geen merker-genen aanwezig ter controle van het modificatieproces. Vanwege de soortverwante genen is hier sprake van de genetische modificatievorm 'cisgenese' en niet van transgenese, waarbij soortvreemd erfelijk materiaal wordt ingebracht. Een onderscheid dat vooral een rol speelt in ethische discussies en de veiligheidsbeoordeling.

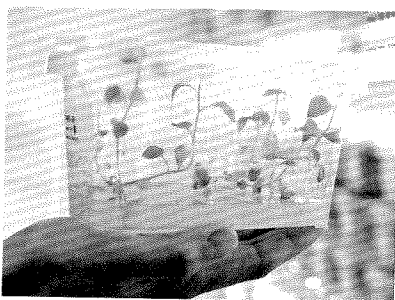
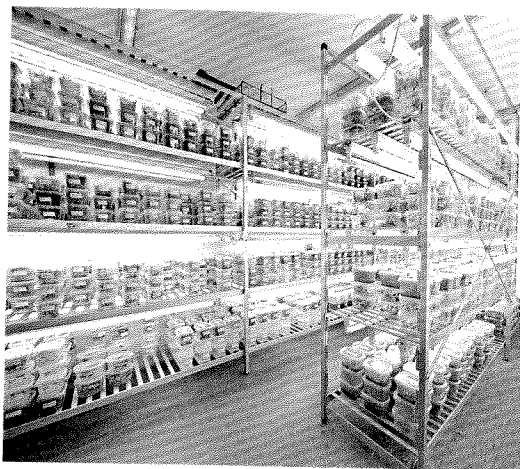
Slim combineren

Vleeshouwers en haar collega's hebben niet de bedoeling om uit te komen op één resistent aardappelras. Daarmee zou *Phytophthora* te veel worden uitgedaagd om de nieuwe resistentie te doorbreken. Het is volgens haar veel slimmer om verschillende resistentiegenen te combineren en te variëren en de verschillende combinaties op een strategische wijze in te zetten. Collega's van onderzoeksproject DuRPh (Duurzame Resistentie tegen Phytophthora), een tienjarig onderzoeksproject van Wageningen UR en het Ministerie van Economische zaken, Landbouw en Innovatie (2006-2015), werken daarom niet alleen aan de ontwikkeling van deze nieuwe aardappelrassen, maar ook aan een programma van resistentiemanagement. Net zoals griepvaccins elk jaar van samenstelling veranderen, is het de bedoeling om de combinaties van resistentiegenen regelmatig af te wisselen. Bovendien is het handig om binnen een regio, of zelfs binnen één veld, te werken met een mix van verschillende resistentiegenen.

Doordat nu meer bekend is over de interactie tussen resistentie- en effectorgenen, is



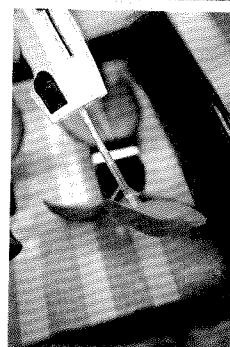
Kweekplaten vol schimmelachtige structuren door *Phytophthora*.



Wageningse klimaatkamer telt duizenden aardappelplantjes. Plantjes worden via weefselkweek en door steeds te stekken in leven gehouden (inzet).



Druppelen van Phytophthora-isolaat op het blad van een aardappelplant, om te zien of dat schade geeft.



het bovendien mogelijk om beter te monitoren welke Phytophthora-variant in een aardappelveld aanwezig is. Boeren hoeven dan alleen bestrijdingsmiddelen toe te passen als een variant aanwezig is waar de betreffende aardappelplanten vatbaar voor zijn. Vleeshouwers werkten vorig jaar mee aan een veldproef waarin dit werd uitgetest. Met een speciale robot werd wekelijks RNA geïsoleerd uit aardappelbladeren om vast te stellen of er sprake was van een Phytophthora-infectie en om te zien welke effectoren hierbij tot expressie kwamen. Zo kon direct worden vastgesteld of het betreffende aardappelveld vatbaar was voor deze variant van Phytophthora en of het nodig was om te spuiten met bestrijdingsmiddelen. "Zo kun je met veel minder spuiten de ziekte

toch onder controle houden", zegt Vleeshouwers.

Alternatieve aanpak

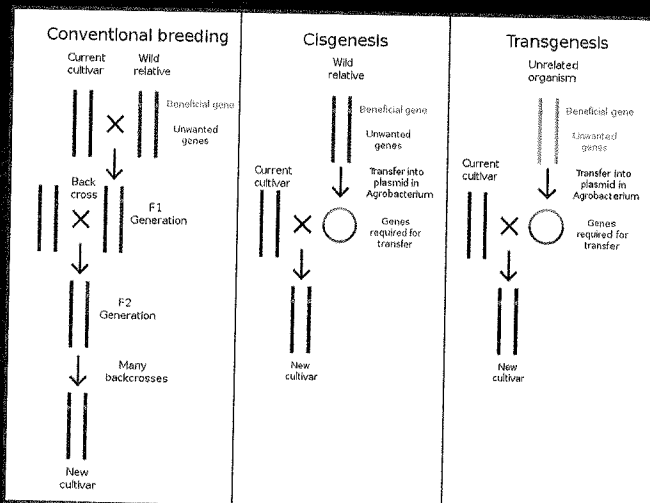
In de toekomst hoopt Vleeshouwers nog andersoortige eiwitten te ontdekken die Phytophthora uitscheidt, naast de effector-eiwitten. "Ons onderzoek is ontstaan uit een vrij pragmatische aanpak, waarmee we ver zijn gekomen. Maar het nadeel van de effectoren is dat Phytophthora de meeste ervan best kan missen. Het is geen enkel probleem om er eentje uit te schakelen, om daarmee een resistentiegen te omzeilen. Ik hoop dat ik andere eiwitten kan vinden die Phytophthora niet kan missen. Met resistentiegenen die deze eiwitten herkennen kun je mogelijk een duurzamere resis-

tentie bereiken." Daar is eerst weer veel fundamenteel onderzoek voor nodig, waarschijnlijk met een grote dosis bioinformatica. Vleeshouwers heeft goede hoop op resultaat. "Er zijn steeds meer gegevens beschikbaar, ook van andere oömyceten. Daardoor kun je steeds meer verbanden zien, wat vroeger niet mogelijk was." **LM**

Klassiek, cis of trans?

De traditionele manier om aardappelrassen te verbeteren is door middel van kruisen. Hierbij wordt een cultuuraardappel gekruist met een wilde aardappelsoort die een resistentiegen bevat. Helaas bevatten nakomelingen van dergelijke kruisingen ook ongewenste eigenschappen van de wilde aardappel. Vandaar dat de veredelaar de planten nog vele malen moet terugkruisen om deze eigenschappen weer te verwijderen. Dit proces kan tientallen jaren in beslag nemen en levert uiteindelijk niet meer dan één resistentiegen op. Aardappelrassen kunnen een stuk efficiënter verbeterd worden door genetische modificatie. Hierbij kunnen meerdere resistentiegenen bij de aardappelplant in het genoom worden gebracht met behulp van de bacterie *Agrobacterium tumefaciens*. Dit kan merkervrij, wat inhoudt dat er geen speciale merkgenen (vaak antibioticumresistentiegenen) worden gebruikt om te controleren of de modificatie is geslaagd. Vanuit ethisch oogpunt wordt onderscheid gemaakt tussen cisgenese en transgenese. Technologisch gezien is er geen verschil, het gaat alleen om de herkomst van de genen die bij de plant worden ingebracht. Bij cisgenese is het nieuwe gen afkomstig van een variant van dezelfde soort, in dit geval een kruisbare wilde aardappelplant. Bij transgenese gaat het om genen die afkomstig zijn uit een heel andere soort. Wageningse wetenschappers pleiten ervoor om cisgenese vrij te stellen van de gebruikelijke regelgeving voor transgene gewassen. De Nederlandse overheid heeft in 2010 echter besloten om dit vooralsnog niet te doen. Belangrijkste reden

is het feit dat niet duidelijk was of cisgenese even veilig is als normale veredeling. Recent heeft de Europese Autoriteit voor Voedselveiligheid (EFSA) gepubliceerd dat dit wel het geval is. De nabije toekomst zal leren of door deze uitspraak cisgenese van de Genetisch Gemodificeerde Organismen (GMO)-regelgeving vrijgesteld kan worden.



Klassieke kruising versus cis- en transgenese