
Titel projectvoorstel: Fenotypische plasticiteit in wortelarchitectuur: de sleutel tot tolerantie voor nematoden in planten?

Nummer: TU18152 (project 3)

Contactgegevens penvoerder: Naam: Johan Hopman
Bedrijf: AVERIS Seeds BV
e-mailadres: johan.hopman@averis.nl

Contactgegevens namens onderzoekers: Naam: Geert Smant
Organisatie: Wageningen Universiteit
e-mailadres: geert.smant@wur.nl

Het projectvoorstel past onder innovatiethema

- Duurzame Plantaardige Productie
- Energie & Water
- Consument, Markt & Maatschappij
- High Tech & Digitale Transformatie

Heeft u het voorstel ook elders ingediend? Nee Ja, te weten bij

Inhoudelijke beschrijving

1. Samenvatting aanvraag

Vatbaarheid van planten voor parasitaire aaltjes hangt niet altijd samen met verlies van biomassa als gevolg van een infectie. Sommige aardappelrassen zijn bijvoorbeeld vatbaar voor aardappelmoehed door aardappelpycnenaaltjes zonder dat een hoge infectiegraad gepaard gaat met veel oogstverlies. Omgekeerd kan een lage infectiegraad van aaltjes op resistente rassen toch een nadelig effect hebben op de bovengrondse groei van planten en zelfs een valplek veroorzaken. Deze fenotypische variatie in groei onder invloed van biotische stress wordt in de praktijk aangeduid met het begrip ziekte-tolerantie. Sommige resistente aardappel- en suikerbietrassen zijn zo weinig tolerant voor aaltjes, dat dit hun inzetbaarheid drastisch beperkt. Tolerantie is vooral bij bodemziekten en -plagen een belangrijke eigenschap, omdat deze nauwelijks zijn uit te roeien binnen economisch rendabele vruchtwisselingschema's. Besmette percelen worden daardoor noodgedwongen steeds vaker uit productie genomen. Ondanks het toenemend belang van tolerantie voor aaltjes wordt bij de veredeling van uitgangsmateriaal nog weinig gericht geselecteerd op deze eigenschap, omdat fundamentele kennis van de genetische en moleculaire basis van tolerantie voor aaltjes in planten ontbreekt.

Dit onderzoeksproject beoogd antwoord te geven op de volgende vragen:

1. Hoe kan tolerantie voor aaltjes in planten eenduidig worden gekwantificeerd?
2. Is er binnen natuurlijke populaties van planten aanzienlijke kwantitatieve variatie voor deze eigenschap aanwezig?
3. Wat is de genetische basis van deze kwantitatieve variatie in tolerantie?
4. Is deze kwantitatieve variatie gebaseerd op veerkracht in architectuur van het wortelstelsel onder invloed van lokale biotische stress door aaltjes?
5. Welke moleculaire en cellulaire processen liggen aan deze veerkracht ten grondslag?

We verwachten dat ziekte-tolerantie als eigenschap in allerlei gewassen naast ziekteresistentie een steeds belangrijkere factor zal gaan worden in toekomstige aaltjesbeheersplannen. Om merker-gestuurde selectie van ziekte-tolerantie in veredelingsprogramma's in de toekomst mogelijk te maken is het belangrijk om eerst meer grip op dit fenomeen te krijgen. Naast mogelijk praktische impact van deze kennis, zal dit project ook meer inzicht geven in basale ontwikkelingsprocessen die een rol spelen bij de veerkracht in de architectuur van wortelstelsel van planten.

2. Beoogde doel

Ondanks het toenemend belang van tolerantie voor aaltjes wordt er bij de veredeling van uitgangsmateriaal nog weinig of niet gericht op geselecteerd.

Dit heeft een aantal redenen, namelijk:

1. In tegenstelling tot blootstelling aan droogte of verzilting is de ruimtelijke variatie in biotische stress door aaltjes zeer groot, zodanig dat zelfs binnen het wortelstelsel van één plant grote verschillen kunnen optreden.
2. Tolerantie voor variabele biotische stress door aaltjes is moeilijk eenduidig te kwantificeren.
3. Het is niet bekend of er voldoende bruikbare kwantitatieve variatie in tolerantie voor aaltjes in natuurlijke populaties van planten aanwezig is.
4. De genetische complexiteit die onder deze kwantitatieve variatie in tolerantie ligt is niet bekend.
5. Het is bovendien niet duidelijk of tolerantie voor bodemziekten en -plagen een sterke negatieve wisselwerking heeft met andere agronomisch wenselijke eigenschappen.

De mate waarin organismen in hun groei en ontwikkeling reageren op snelle en grote variaties in omstandigheden wordt in de wetenschappelijke literatuur ook wel aangeduid als **fenotypische plasticiteit (of veerkracht)**. Uit onderzoek met dieren blijkt dat fenotypische plasticiteit voor sommige abiotische stress factoren geassocieerd is met allelische variatie in allerlei transcriptie factoren. Specifieke allelen van deze transcriptie factoren kunnen verklaren waarom sommige individuen bijvoorbeeld veel sterker reageren op snelle veranderingen in temperatuur dan andere.

Het idee achter dit projectvoorstel is dat **tolerantie voor aaltjes het gevolg is van fenotypische plasticiteit in de architectuur van het wortelstelsel** van planten. Wij denken dat in een tolerant gewas biotische stress op één plek in

het wortelstelsel wordt gecompenseerd door extra groei elders in het wortelstelsel. Wij vermoeden dat natuurlijke variatie in transcriptie factoren de **fenotypische plasticiteit van het wortelstelsel** onder biotische stress bepaalt. Het is hierbij van belang om te bedenken dat de microscopisch kleine aaltjes zich in de bodem nauwelijks verplaatsen. Biotische stress als gevolg van blootstelling aan aaltjes is daardoor dus ruimtelijke gezien een heterogene variabele in de rhizosfeer van een plant.

Het tweede uitgangspunt is dat **aanzienlijke genetische variatie voor de plasticiteit van het wortelstelsel bij biotische stress** in natuurlijke populaties van planten aanwezig is. Met andere woorden, wij denken dat sommige individuen in een natuurlijke populatie van planten beter instaat zijn om schade aan het wortelstelsel door aaltjes op te vangen dan andere. Om dit idee te testen willen wij **de invloed van variabele biotische stress door bietencystenaaltjes (*Heterodera schachtii*) op de architectuur van het wortelstelsel van Arabidopsis gaan onderzoeken.**

Om doelgerichte selectie op tolerantie voor aaltjes in uitgangsmateriaal in de toekomst mogelijk te maken zal dit fundamentele onderzoeksproject de volgende vragen beantwoorden:

1. Kan de 'leaf area index' (LAI) worden gebruikt als indirecte, niet-destructieve parameter voor fenotypische plasticiteit van de wortelarchitectuur bij variabele biotische stress?
2. Hoe groot is de kwantitatieve variatie in LAI bij oplopende inoculatie-dichtheden met cystenaaltjes in natuurlijke populaties van planten?
3. In hoeverre is er verklarende allelische variatie voor deze eigenschap in natuurlijke populaties van planten aanwezig?
4. Wat is de genetische basis van plasticiteit in wortelarchitectuur onder invloed van cystenaaltjes in Arabidopsis?
5. Welke moleculaire en cellulaire mechanismen liggen aan deze vorm van fenotypische plasticiteit ten grondslag?
6. Is deze fenotypische plasticiteit specifiek voor biotische stress door cystenaaltjes of is het ook van toepassing op andere families van plant parasitaire aaltjes (bijv. wortelknobbelaaltjes en wortellesieaaltjes)?

3. Beoogde impact

De beoogde impact van dit fundamentele onderzoeksvoorstel is in de eerste plaats vooral wetenschappelijk. Wij beschouwen infecties door plant parasitaire aaltjes ruimtelijk gezien als een heterogene stress factor in het wortelstelsel van planten. In tegenstelling tot bijvoorbeeld infecties door bacteriën, schimmels en virussen is er bij infecties door aaltjes geen sprake van kolonisatie van de gastheer. Veel cystenaaltjes hebben bijvoorbeeld maar één generatie per jaar met een zeer lage reproductiefactor. Het duurt dus een aantal jaren na een introductie voordat populatiedichtheden van aaltjes zo hoog zijn dat schadedrempels worden overschreden. Iedere invasie door een aaltje is dus een geïsoleerde gebeurtenis die een afzonderlijke reactie van de plant oproept op de plaats van infectie maar waarschijnlijk ook elders in het wortelstelsel. Dit biedt een unieke kans om onderzoek te doen aan de veerkracht van het wortelstelsel als gevolg van lokale biotische stress.

Zoals bij elk biologisch systeem zal de veerkracht van het wortelstelsel begrensd zijn. In de wetenschappelijke literatuur wordt zo'n begrenzing van een veerkrachtig systeem ook wel aangeduid als kantelpunt ("tipping point"). Wij denken dat deze begrenzing in de praktijk wordt ervaren als het tolerantieniveau van een gewas. Het concept van ziekte-tolerantie als "tipping point" in een veerkrachtig systeem is wetenschappelijk nog niet eerder onderzocht. Dit onderzoek zal daarom nieuwe fundamentele inzichten bieden in genetische en moleculaire basis van "tipping points" in de architectuur van het wortelstelsel onder blootstelling aan ruimtelijke heterogene stress factoren. Wij gaan onderzoeken of het "tipping point" daadwerkelijk een kwantitatieve eigenschap van planten is en we zullen de onderliggende genetische complexiteit van dit fenomeen blootleggen.

Ondanks dat de beoogde resultaten van dit fundamentele onderzoeksvoorstel niet direct toepasbaar zijn in de praktijk van de veredelingsbedrijven, zal de kennis wel van groot belang zijn voor de sector. Mocht blijken dat het tolerantieniveau inderdaad correspondeert met de begrenzing van het wortelstelsel als veerkrachtig systeem en dat deze begrenzing inderdaad een kwantitatieve eigenschap is in planten, dan biedt dit een belangrijk nieuw aanknopingspunt voor veredeling op tolerantie. Ons onderzoek zal vervolgens ook inzicht geven in de genetische complexiteit van de veerkracht van het wortelstelsel onder biotische stress door aaltjes. Inzicht in de genetische complexiteit van deze (vermoedelijk) kwantitatieve eigenschap biedt bedrijven de kans om in te schatten hoeveel inzet nodig zal zijn om in de toekomst op veerkracht van het wortelstelsel te veredelen. Veredelen op complexe eigenschappen vraagt immers aanzienlijk meer inzet van middelen en technologie, dan bijvoorbeeld dominante resistentie tegen aaltjes.

Het maatschappelijke belang van dit fundamenteel onderzoeksproject ligt in de bijdrage aan het behoud en toename van productiviteit van de teelt van belangrijke voedselgewassen zonder gebruik van chemische gewasbeschermingsmiddelen. Door het uitfaseren van chemisch bestrijding van aaltjes leunt men bij veel teelten momenteel op de toepassing van ziekteresistenties en vruchtwisseling. Aangezien de genetisch basis van resistenties tegen aaltjes in veel gewassen erg smal is, vormt deze afhankelijkheid een aanzienlijk risico. Het uitroeien van aaltjes is bovendien binnen huidige economische rendabele vruchtwisselingschema niet mogelijk. Dit betekent dat in sommige gebieden een aaltjes-vrije teelt steeds moeilijker gerealiseerd kan worden. Bij teelten voor de verwerkingsindustrie hoeft dit geen onoverkomelijk obstakel te zijn als er maar meer tolerante rassen beschikbaar komen. Het is dan ook onze stellige overtuiging dat in toekomstige aaltjesbeheersingsplannen tolerantie naast resistentie een dominante rol gaat spelen. Dit projectvoorstel beoogt de fundamentele kennisbasis voor deze ontwikkeling aan te leggen.

4. Aanpak van het project (uitgebreid meerjarig werkplan in Bijlage 2)

Voor het koppelen van genetische diversiteit aan ziekte tolerantie in een natuurlijke populatie van planten gaan we gebruik maken van een collectie van *Arabidopsis thaliana* lijnen met vergelijkbare vatbaarheid voor cystenaaltjes. *Arabidopsis* is een waardplant van het bietencystenaaltje (*Heterodera schachtii*), maar herbergt voor zover bekend geen *major* resistentie genen tegen deze parasiet. Dit is belangrijk, omdat het kwantificeren van tolerantie in planten het beste gedaan kan worden zonder segregerende resistentie genen in de achtergrond.

De eerste stap in het onderzoek is het bepalen van een robuuste maatstaf voor tolerantie in *Arabidopsis* voor bietencystenaaltjes. Uit eigen vooronderzoek blijkt dat vatbare planten bij lage inoculatie dichtheden van aaltjes geen respons in bovengrondse groei laten zien. Pas bij het overschrijden van een kritische dichtheid treedt er exponentiele afname van bovengrondse biomassa op. Deze **kritisch dichtheid fungeert als een kantelpunt** waarna het wortelstelsel niet langer kan compenseren voor schade en andere biotische stress door aaltjes. **De hypothese is dat deze kritische dichtheid afhankelijk is van de fenotypische plasticiteit (veerkracht) in wortelarchitectuur van de plant.**

In **werkpakket 1** gaan we testen in hoeverre het verloop van de 'leaf-area index' (LAI) tijdens het infectieproces gebruikt kan worden als indirecte maatstaf voor kwantitatieve variatie in fenotypische plasticiteit van het wortelstelsel. Het volgen van de biomassa van het wortelstelsel bij verschillende dichtheden in de tijd is destructief en leent zich daarom niet voor grootschalig fenotyperingsonderzoek (in werkpakket 2). Bovendien sluit het meten van de LAI aan bij de perceptie van ziekte tolerantie in de praktijk, namelijk het ontstaan van valplekken bij minder tolerante rassen.

In **werkpakket 2** gaan we de kwantitatieve variatie in LAI rondom kritisch inoculatie dichtheden bepalen in een populatie van ± 150 genetisch diverse *Arabidopsis* lijnen met vergelijkbare vatbaarheid voor *H. schachtii*. Hiertoe zal de LAI in de tijd worden gevolgd bij drie lage inoculatie dichtheden (geen nematoden, ruim onder bekende kritische dichtheden, en ruim boven bekende kritische dichtheden).

In **werkpakket 3** gaan we met behulp van 'genome-wide association' analyses zoeken naar koppelingen tussen plasticiteit in LAI en allelische variatie (SNPs) in *Arabidopsis*. Op basis van de geschatte koppeling tussen significante SNPs en flankerende regio's zullen de grenzen van zogenaamde tolerantie-QTLs worden bepaald.

Kandidaat genen die binnen de grenzen van deze tolerantie-QTLs liggen zullen in **werkpakket 4** nader worden onderzocht op betrokkenheid bij plasticiteit van de LAI bij variabele biotische stress in het wortelstelsel. Hiervoor zullen t-DNA-insertie mutanten gebruikt worden, die voor de meeste genen inmiddels wel beschikbaar zijn. Van *Arabidopsis* t-DNA-mutanten met afwijkende plasticiteit in LAI gaan we de architectuur van het wortelstelsel onderzoeken bij verschillende inoculatie dichtheden met *H. schachtii*. Met behulp transcriptome en metabolome analyses zal vastgesteld worden welke moleculaire netwerken en biologische processen differentieel gereguleerd worden in deze mutanten.

Het is niet bekend wat de belangrijkste oorzaak is van biotisch stress door cystenaaltjes in het wortelstelsel van geïnfecteerde planten. Bij het binnendringen van de wortels ontstaat veel directe schade aan weefsels door invasieve juvenielen. Dit zal ongetwijfeld biotische stress tot gevolg hebben in omliggende weefsels. Maar na het binnendringen nestelen deze juvenielen zich op één plek in de wortel om zich gedurende enkele weken aan een klein groepje cellen te voeden. Dit langdurig onttrekken van voeding aan plantencellen zou ook biotisch stress kunnen veroorzaken. In **werkpakket 5** willen we onderzoeken of schade bij invasie, het langdurig onttrekken van voeding, of beide oorzaken van stress belangrijk zijn bij het induceren van veranderingen in de wortelarchitectuur. Dit gaan we doen door *Arabidopsis*

ecotypes die extreem veel of weinig tolerantie vertonen voor cystenaaltjes (in werkpakket 1) ook te testen met wortelgiesaaltjes (*Pratylenchus*) en wortelknobbelaaltjes (*Meloidogyne*). Wortelgiesaaltjes veroorzaken veel directe schade aan wortels van geïnfecteerde planten, maar nestelen zich niet op één plek in de wortel en ze onttrekken maar heel kort voeding uit omliggende plantencellen. Wortelknobbelaaltjes daarentegen veroorzaken nauwelijks directe schade bij het binnendringen, maar nestelen zich wel op één plek en onttrekken ook langdurig voeding aan een klein groepje omliggende cellen. We willen deze experimentele opzet ook gebruiken voor het testen van de t-DNA-mutanten van kandidaat tolerantie genen (uit werkpakket 4).

Tot slot is met het oog op een mogelijk toekomstige toepassing belangrijk om een inschatting te maken van de kans dat onze resultaten met *Arabidopsis* specifiek zijn voor dit modelsysteem. Hierbij komen een aantal belangrijke vragen aan de orde, namelijk: Zijn er orthologen van de tolerantie genen uit *Arabidopsis* aanwezig in genomen van niet-verwante plantensoorten? Hoe groot is de genetische diversiteit in deze orthologen binnen families waartoe deze soorten behoren? Zijn er aanwijzingen voor de aanwezigheid van tolerantie in soorten waarin deze orthologen voorkomen? Wij zullen samen en in overleg met de deelnemende bedrijven in **werkpakket 6** deze vragen voor tenminste één andere plantensoort adresseren. Dit zal voornamelijk plaatsvinden met behulp van genoomsequentie analyses. Daarnaast zal worden onderzocht in hoeverre variatie in de LAI van tenminste één andere soort kan worden verklaard door variatie in inoculumdichtheid van aaltjes. De afwezigheid van een sterke correlatie tussen beide variabelen is een eerste indicatie voor aanwezigheid van tolerantie. Het onderzoek in dit werkpakket heeft een explorerend karakter en dient als mogelijke opstap voor nader industrieel vervolgonderzoek naar tolerantie voor biotische stress tegen bodemziekten en -plagen in cultuurgewassen.

5. Organisatie (uitgebreide beschrijving van consortiumpartners in Bijlage 1)

Tolerantie voor aaltjes gaat in de toekomst een belangrijke rol spelen bij de teelt van diverse gewassen. Dit is de belangrijkste reden waarom wij gekozen hebben voor een brede vertegenwoordiging van het bedrijfsleven in het consortium. In de portfolio's van de **vijf deelnemende bedrijven** (AVERIS Seeds, Joordens Zaden, Meijer Potato, Solynta, en Rijk Zwaan) gaat het onder andere om consumptie- en zetmeelaardappelen, groenbemesters, en diverse groente gewassen. Daarnaast is de akkerbouwsector als geheel in het consortium ook vertegenwoordigd door middel van de deelname van de **Brancheorganisatie Akkerbouw**.

Toezicht op de voortgang van het onderzoek zal plaatsvinden middels halfjaarlijkse projectbijeenkomsten waarin de kennisinstelling mondeling en schriftelijk zal rapporteren over de resultaten van de voorgaande 6 maanden en de plannen voor komende 6 maanden. Op grond van inschatting van de kennisinstelling zal ook regelmatig worden gerapporteerd over mogelijke kansen op verwerven IP-posities op basis van projectresultaten.

Er is gekozen voor het Laboratorium voor Nematologie van Wageningen Universiteit (WU-NEMA) als kennisinstelling voor de uitvoering van dit project vanwege haar toonaangevend rol bij fundamenteel onderzoek aan nematode-plant interacties. Medewerkers van dit laboratorium hebben bijvoorbeeld recent met behulp van 'genome-wide association mapping' de genetische architectuur van vatbaarheid van *Arabidopsis* voor wortelknobbelaaltjes ontrafeld (Warmerdam et al 2018. *New Phytologist* 218:724). WU-NEMA heeft bovendien in het kader van diverse PPS-projecten (TKI, NWO, en EU) jarenlange ervaring met onderzoek naar resistenties tegen cystenaaltjes en wortelknobbelaaltjes. Met haar kennis, ervaring en beschikbare onderzoeksfaciliteiten is WU-NEMA bij uitstek toegerust voor dit onderzoeksproject.

6. Communicatie

Het grootste deel van het budget van dit fundamentele onderzoeksproject zal worden ingezet voor de aanstelling van een promovendus/a en de resultaten van het onderzoek zullen worden gepubliceerd in een proefschrift. Het is in de plantenwetenschappen te doen gebruikelijk dat afzonderlijke hoofdstukken van proefschriften ook apart in peer-reviewed wetenschappelijke tijdschriften verschijnen. Zowel het proefschrift als geheel als de afzonderlijke publicaties die eruit voortkomen zullen bijdragen aan de wetenschappelijke disseminatie van de belangrijkste nieuwe inzichten. Daarnaast zal de promovendus/a actief interacties zoeken met andere wetenschappers door middel van congresbijdragen en werkbezoeken.

De communicatie van de nieuwste inzichten naar mogelijke gebruikers zal lopen via de bedrijven die aan het consortium deelnemen en via de Branche Organisatie Akkerbouw. De Branche Organisatie organiseert samen met LTO regelmatig thematische workshops voor telers, erfbetreders en andere belanghebbenden over de problematiek rondom