

# Wetenschappelijk achtergronddossier *Phytophthora*-resistente aardappelen



## *Phytophthora*-resistente aardappelen

*Phytophthora infestans* veroorzaakt de 'aardappelziekte'. Dit is de meest bedreigende ziekte voor de aardappelteelt in regio's met een gematigd klimaat. Ze kost landbouwers in België jaarlijks ongeveer 55 miljoen euro en de bestrijding ervan brengt een behoorlijke milieubelasting met zich mee. Sinds enkele jaren zijn er echter enkele conventioneel veredelde resistente rassen op de markt, en wordt er gewerkt aan de ontwikkeling van genetisch gewijzigde *Phytophthora*-resistente lijnen. De conventioneel resistente rassen zijn ontstaan na een complex en jarenlang durend veredelingsprogramma. De rassen Bionica en Toluca bezitten één resistentiegen. Sarpo Mira een mengeling van verschillende genen die een hoge resistentie als resultaat hebben. De rassen worden vandaag in beperkte mate gebruikt, en voornamelijk in de biologische teelt. Bionica en Toluca worden enkel voor de versmarkt geteeld. Ze beschikken niet over de juiste eigenschappen voor industriële verwerking. Sarpo Mira wordt onder meer verwerkt tot friet.

In de genetisch gewijzigde *Phytophthora*-resistente aardappelen die in ontwikkeling zijn worden vaak meerdere resistentiegenen tegelijk binnengebracht en meteen ook in een ras met voor de industrie interessante eigenschappen. Dergelijke aardappelen zijn nog niet op de markt, maar worden op verschillende plaatsen in veldproeven uitgetest. Het zal naar alle waarschijnlijkheid nog tot minimaal 2013 duren voordat dergelijke aardappelen op de markt beschikbaar zullen zijn.

## Over dit dossier

In dit achtergrond dossier geeft VIB (Vlaams Instituut voor Biotechnologie) een overzicht van de wetenschappelijke kennis over aardappelen resistent tegen *Phytophthora infestans*, beter bekend als 'de aardappelziekte'. VIB is een wetenschappelijke instelling met 1200 onderzoekers, met onderzoeksgroepen aan de UGent, K.U.Leuven, Universiteit Antwerpen en Vrije Universiteit Brussel. De Vlaamse overheid heeft VIB de taak gegeven om wetenschappelijk onderbouwde informatie over biotechnologie te verspreiden.

## Over de referenties

Bij elke paragraaf in dit dossier vindt u de referenties naar de publicaties waaruit de informatie werd geput. Die publicaties kunt u soms integraal downloaden, soms zijn de publicaties niet vrij verkrijgbaar. In dat geval kan u de auteur raadplegen of de publicatie opzoeken in de dichtst bijgelegen universiteitsbibliotheek.

<i>Phytophthora</i> -resistente aardappelen.....	2
Over dit dossier.....	3
Over de referenties.....	3
België kent een bloeiende aardappelverwerkende sector.....	5
<i>Phytophthora infestans</i> – ‘de aardappelziekte’ – is de grootste bedreiging voor de aardappelteelt.....	6
<i>Phytophthora infestans</i> tast zowel de plant als de knol aan en is zeer besmettelijk.....	7
<i>Phytophthora infestans</i> is over de jaren heen agressiever geworden.....	8
<i>Phytophthora infestans</i> veroorzaakt zeer grote kosten.....	9
De milieubelasting veroorzaakt door de bestrijding van <i>Phytophthora infestans</i> .....	9
Manieren om de <i>Phytophthora</i> ziektedruk laag te houden.....	9
Het telen van resistente rassen is de beste manier om de ziektedruk naar beneden te halen.....	10
Bij ziekte is snel optreden een noodzaak.....	10
Conventionele resistentieveredeling.....	11
Enkelvoudige resistentiegenen worden door <i>Phytophthora</i> gemakkelijk doorbroken.....	13
Het introduceren van resistentie tegen <i>Phytophthora infestans</i> met behulp van genetische modificatie.....	14
Genetische modificatie voor resistentie tegen <i>Phytophthora infestans</i> in stappen.....	14
De teelt van conventioneel resistente rassen.....	17
Duurzame resistentie.....	18
De Fortuna-aardappel van BASF.....	18
Het cisgenese-project DuRPh.....	19
Cisgenese is onderwerp van regulatoire discussies op EU-niveau.....	20
Genetisch gewijzigde <i>Phytophthora</i> -resistente aardappelen vormen geen bedreiging voor het leefmilieu.....	20
De voedselveiligheid van genetisch gewijzigde <i>Phytophthora</i> -resistente aardappelen.....	21
Genetisch gewijzigde <i>Phytophthora</i> -resistente aardappelen zijn voorlopig nog niet op de markt.....	22

## Aardappelen worden wereldwijd geteeld, en ook in België

De aardappelteelt is belangrijk als bron van voedsel en zetmeel. Aardappelen worden in meer dan 100 landen geteeld. In 2006 werd er een wereldwijd totaal van 315 miljoen ton aardappelen geproduceerd. China en India zijn samen verantwoordelijk voor meer dan 30% van de aardappelproductie.

Aardappelen zijn oorspronkelijk afkomstig uit het Andes gebergte in Zuid-Amerika. Daar worden ze al meer dan 7000 jaar geteeld. Ontdekkingsreizigers hebben ze in 1565 vanuit de Andes meegebracht naar Europa waar ze gedurende een lange tijd belanden in botanische tuinen. Na opeenvolgende misoogsten bij de traditionele granen werden ze opgepikt als voedingsgewas en zijn ze vanuit Europa aan een wereldwijde opmars begonnen. Aardappelen groeien het beste in gematigde klimaten met een voldoende lange vorstvrije periode. Beneden de 10 °C en boven de 25 °C is de knolgroei geremd.

Er wordt een onderscheid gemaakt tussen drie soorten aardappelteelt: pootaardappelen, consumptieaardappelen en zetmeelaardappelen. De pootaardappelteelt zorgt voor de vermeerdering van het plantgoed. Nederland is hierin gespecialiseerd en exporteert plantgoed naar landen over de hele wereld. De teelt van consumptieaardappelen is het belangrijkste. Deze teelt levert de aardappelen die wij allemaal eten; van kookaardappelen tot diepvriesfrietten, maar ook snacks zoals chips. De zetmeelaardappelen produceren zetmeel voor industriële toepassingen: voor lijmen, textiel, papier, bouwmaterialen, etc. Zetmeelaardappelrassen zijn speciaal geselecteerd op hun geschiktheid voor de productie van zetmeel voor industriële toepassingen. Je kunt ze wel eten, maar echt lekker zijn ze niet.

In België is het aardappelareaal fors gestegen naar bijna 81.000 hectare in 2010. Dit levert een jaarlijkse aardappelproductie op die de 3 miljoen ton overstijgt. Vlaanderen neemt het grootste deel van de productie voor zijn rekening, 55 à 60% van het totaal. In België worden voor het overgrote deel consumptieaardappelen geteeld. De rest zijn pootaardappelen. Er vindt in België geen teelt van zetmeelaardappelen plaats.

[www.potato2008.org](http://www.potato2008.org)

## België kent een bloeiende aardappelverwerkende sector

In België wordt jaarlijks ongeveer 3 miljoen ton aardappelen verwerkt in een bloeiende en groeiende aardappelverwerkende sector. Dit zijn voor het overgrote deel familiale bedrijven, die echter wel sterk internationaal geïntereerd zijn.

Het feit dat de hoeveelheid aardappelen die in België geproduceerd wordt gelijk is aan de hoeveelheid die in België verwerkt wordt, betekent niet dat alle Belgische aardappelen in België

verwerkt worden. Er is een sterke handel in aardappel met de ons omringende landen met als gevolg dat een deel van de in België geproduceerde aardappelen in het buitenland verwerkt worden en een deel van de in België verwerkte aardappelen uit het buitenland afkomstig is.

Consumptieaardappelen worden in België verwerkt tot een breed spectrum van aardappelproducten: van (diepvries)frietten tot puree, van kroket tot wafeltje en van chips tot aardappelvlokken. In tegenstelling tot de aardappelverwerkende industrie in sommige andere landen, voeren de aardappelverwerkende bedrijven hier nauwelijks eigen merken. Lutosa is een van de weinige uitzonderingen. Het gros van de bedrijven maakt producten voor niet-eigen (huis)merken.

[www.belgapom.be](http://www.belgapom.be)

### ***Phytophthora infestans* – ‘de aardappelziekte’ – is de grootste bedreiging voor de aardappelteelt**

De aardappelteelt kent verschillende ziekten en plagen, maar ‘de aardappelziekte’ vormt de grootste bedreiging in teeltregio’s met een gematigd klimaat. Andere bedreigingen zijn nematoden (*Globodera pallida*, *Globodera rostochiensis* en *Meloidogyne spp*), en enkele bacterieziekten zoals bruinrot (*Ralstonia solanacearum*), ringrot (*Clavibacter michiganensis*) en zwartbenigheid (*Dickeya spp*). De aardappelziekte wordt veroorzaakt door de oömyceet *Phytophthora infestans*, een schimmelachtig organisme. De aardappelziekte is het best gekend vanwege de ‘Great Famine’ in Ierland rond 1845. De ziekte veroorzaakte in enkele achtereenvolgende jaren in de aardappelteelt in Ierland grote misoogsten en zorgde zo voor een ommekeer in de Ierse geschiedenis. Ongeveer een miljoen Ieren stierven als gevolg van de hongersnood en ongeveer net zoveel veel Ieren emigreerden, met name naar de Verenigde Staten om daar een nieuw leven op te bouwen. *Phytophthora infestans* is in 1843 vanuit Midden-Amerika via de Verenigde Staten de Atlantische Oceaan overgestoken en zo in Europa terecht gekomen. De ‘Great Famine’ volgde slechts twee jaar later.

De vatbaarheid van aardappelen voor *Phytophthora infestans* verschilt van ras tot ras, maar slechts zeer weinig rassen bezitten een echte resistentie. Het ras Bintje, dat vandaag nog altijd tussen de 40 en 50 procent van de Vlaamse aardappelteelt beslaat, is erg vatbaar voor de ziekte. Aardappeltelers in Vlaanderen spuiten hun gewas elk jaar 10 tot 15 keer, met middelen die een behoorlijke milieubelasting met zich meebrengen. Het aantal noodzakelijke bespuitingen is sterk afhankelijk van de weersomstandigheden

## ***Phytophthora infestans* tast zowel de plant als de knol aan en is zeer besmettelijk**

*Phytophthora infestans* tast zowel het blad, de stengel, als de knol aan. Bij aantasting ontstaan op de bladeren 'lesies' (bladvlekken). Het uiterlijk ervan hangt sterk af van de weersomstandigheden. Meestal zie je vlekken van 1 tot 2 cm doorsnee die langzaam verkleuren tot donkerbruin. De bruine vlekken zijn aanvankelijk omringd door een gele rand. Aan de onderkant van het blad is bij vochtig weer wit schimmelpuis zichtbaar. Onder voor de schimmel gunstige groeicondities zullen aangetaste bladeren uiteindelijk volledig verschrompelen. Op de stengels komen grote langwerpige bruingekeurde lesies voor die de gehele stengel omvatten. De knollen worden aangetast via ogen of barstjes in de schil en de besmetting kan zowel gebeuren tijdens de groei als tijdens de oogst en de bewaring. De aantasting wordt zichtbaar als blauwachtige, door de schil schemerende vlekken die na verloop van tijd roestbruin kleuren. Vaak gaat de aantasting van de knol over in droog- of natrot (bacterie-aantasting), en het natrot kan dan overgaan op niet aangetaste knollen. Zo kan een beperkt aantal door *Phytophthora infestans* aangetaste knollen uiteindelijk leiden tot aanzienlijke bewaarverliezen.



*Foto: een veld aardappelen met een verregaande aantasting door Phytophthora*

*Phytophthora* gedijt het beste bij gematigde temperaturen en een hoge relatieve vochtigheid. Een vlotte penetratie in het blad vereist een voldoende lange bladnatperiode. De ziekte verspreidt zich vooral via ongeslachtelijke sporen (zoösporangieën) die gevormd worden door het witte schimmelpluis. De ziekte is zeer besmettelijk. De sporen worden met de wind of via opspattende regendruppels verspreid.



Foto: de gevolgen van *Phytophthora* in aangetaste knollen.

*Phytophthora infestans* overleeft de winter onder de vorm van schimmeldraden in aangetaste knollen. Afvalhopen met aardappelen zijn beruchte plaatsen van overleving van de ziekte. Ook opslagplanten uit op het veld achtergebleven knollen zijn belangrijk als overwinteringsmechanisme. Sinds een aantal jaren overleeft de ziekte echter ook via geslachtelijke sporen (oösporen), die ontstaan door het bij elkaar komen van de zogenoemde A1 en A2 'mating types'. Het A2 mating type kwam vroeger niet in ons teeltgebied voor zodat het overleven via oösporen een vrij recent verschijnsel is. Oösporen overleven 1 tot 3 jaar in de bodem en kunnen vooral bij een te enge vruchtwisseling voor verspreiding van de ziekte zorgen.

<http://www.agris.be/nl/aardappelziekte/194003.asp#alg>

### ***Phytophthora infestans* is over de jaren heen agressiever geworden**

De bestrijding van de ziekte is in de loop van de jaren moeilijker geworden, omdat binnen de *Phytophthora infestans* populatie agressievere isolaten zijn geselecteerd, en de diversiteit groter is geworden door recombinatie tussen verschillende 'mating types' die voorheen niet in hetzelfde gebied voorkwamen. De toenemende agressiviteit uit zich door een kortere

penetratieduur en ziektecyclus, meer generaties in eenzelfde groeiseizoen en een grotere temperatuurtolerantie.

### ***Phytophthora infestans* veroorzaakt zeer grote kosten**

In Europa worden bijna 2 miljoen hectare aardappelen verbouwd, en de oogst daarvan vertegenwoordigt een waarde van om en nabij de 6 miljard euro. Geschat wordt dat de aardappelziekte in Europa tot een economische schade leidt van ongeveer 1 miljard euro. Deze schade bestaat uit kosten voor het bestrijden van de ziekte (kosten voor aanschaf van fungiciden + kosten van de spuitwerkzaamheden) en de kosten als gevolg van opbrengstderving en bewaarverliezen. Voor de Belgische aardappeltelers betekent de aardappelziekte een jaarlijkse kostenpost van grofweg 55 miljoen euro.

*Haverkort et al., Societal Costs of Late Blight in Potato and Prospects of Durable Resistance Through Cisgenic Modification, Potato Research (2008) 51:47-57*

### ***De milieubelasting veroorzaakt door de bestrijding van Phytophthora infestans***

In België wordt jaarlijks een grote hoeveelheid fungicide gebruikt voor het realiseren van een voldoende controle van *Phytophthora*: ruim 1000 ton werkzame stof per jaar. In Vlaanderen wordt gemiddeld ongeveer 17 kg werkzame stof per hectare per jaar toegepast voor de bestrijding van *Phytophthora*. De drie belangrijkste werkzame stoffen zijn (in volgorde van aflopende belangrijkheid): mancozeb, cymoxanil, en propamocarb.

*Bron: Vlaamse overheid, Departement Landbouw en Voeding, Afdeling Monitoring en Studie – LMN, data 2008*

### ***Manieren om de Phytophthora ziektedruk laag te houden***

Belangrijke maatregelen om de ziektedruk te beperken zijn het bestrijden van opslagplanten, en het vernietigen van aardappelen in afvalhopen. In sommige landen bestaan hiertoe verplichtingen. Hiermee voorkom je haarden van *Phytophthora* van waaruit de ziekte zich verder kan verspreiden, maar hiermee kun je geen geslachtelijke sporen (oösporen) bestrijden. Een voldoende ruime vruchtwisseling is effectief tegen een verspreiding van de ziekte via oösporen. Een tweede manier om de ziektedruk naar beneden te halen is het minitieus opvolgen van de instructies van de waarschuwingdiensten. Een laatste optie is de

aardappelteelt zelf te verminderen – hoe minder aardappelteelt, hoe lager de ziektedruk, maar dat is natuurlijk moeilijk te realiseren in een aardappelland als België.

## Het telen van resistente rassen is de beste manier om de ziektedruk naar beneden te halen

In een land met een intensieve aardappelteelt is de beste manier om de ziektedruk naar beneden te halen het telen van resistente rassen. Hoe groter het areaal resistente rassen, hoe lager de ziektedruk. Belangrijk hierbij is dat voldoende verschillende resistentiegenen worden ingebracht zodat er niet ontstaat een te sterke selectiedruk op het beperkt aantal resistentiegenen met een snelle aanpassing van de *Phytophthora*-populatie tot gevolg.

Het areaal resistente rassen hoeft waarschijnlijk geen 100% te zijn om de ziektedruk voldoende naar beneden te halen. Neem ter vergelijking het voorbeeld van de virusresistente papaya op Hawaii. Tachtig procent van het papaya-areaal is daar beplant met resistente rassen, en dat haalt de ziektedruk voldoende naar beneden om de overige 20% van het areaal met niet-resistente rassen te beplanten, zonder dat dit ziekteproblemen geeft. Vandaag zijn er echter nog maar een paar echt resistente aardappelrassen beschikbaar: de rassen Bionica, Toluca en Sarpo Mira. Over deze rassen verderop meer.

## Bij ziekte is snel optreden een noodzaak

Wanneer er *Phytophthora* in een perceel geconstateerd wordt is snel optreden een noodzaak. In de praktijk wordt de ziekte onder controle gehouden door het inzetten van fungiciden. Hierbij dient om voldoende goede resultaten te hebben preventief (behandelingen voor de penetratie van de schimmel in de plant is gebeurd) opgedreden te worden. Slechts een beperkt aantal middelen heeft een beperkte dodende werking.

Loofvernietiging is een andere efficiënte methode om een verdere verspreiding binnen en buiten het perceel te voorkomen. Het vernietigen van het loof op het moment dat het gewas nog niet oogstrijp is, heeft echter grote consequenties. Zeker bij laatrijpe rassen vindt nog sterke knolgroei plaats in de laatste weken voor de oogst. Vroegtijdig het loof vernietigen betekent dan ook verlies van opbrengstpotentieel. In plaats van 45 tot 60 ton per hectare wordt er misschien maar 35 ton per hectare geoogst, of nog minder. Loofvernietiging wordt dan ook maar meestal aangewend bij loof dat al aan het afsterven is.

## Conventionele resistentieveredeling

### ***Bionica en Toluca***

In Nederland is men ruim 40 jaar geleden begonnen om natuurlijke resistentiegenen in te kruisen in commercieel bruikbare aardappelrassen. De resistentiegenen zijn afkomstig van wilde, knoldragende *Solanaceae* uit de Andes. De allereerste kruising dateert uit 1959 en het heeft tot 2005 geduurd vooraleer hieruit enkele bruikbare rassen zijn ontstaan: Bionica en Toluca. De beide rassen bevatten hetzelfde, enkelvoudige resistentiegen *Rpi-blb-2* uit *Solanum bulbocastanum*.

Het op klassieke wijze inkruisen van resistentiegenen in de cultuuraardappel vergt veel werk en geduld. De aardappel kan immers met de meeste wilde verwanten waarin de resistentiegenen aanwezig zijn, niet altijd rechtstreeks kruisen. Er moet dan een ingewikkelder kruisingsschema toegepast worden waarin gebruik gemaakt wordt van zogenoemde 'brugkruisingen'. Het laat ook enkel toe om één resistentiegen per keer in te kruisen, tenzij je het geluk hebt dat de wilde verwant meerdere resistentiegenen bevat, en die resistentiegenen heel dicht bij elkaar in de buurt liggen op het DNA van die wilde verwant. Na het kruisen met wilde verwanten zijn bovendien talrijke terugkruisingen noodzakelijk om de gewenste cultuuraardappeleigenschappen terug te krijgen. Hieronder staat het kruisingsschema weergegeven dat geleid heeft tot de resistente conventionele rassen Bionica en Toluca.

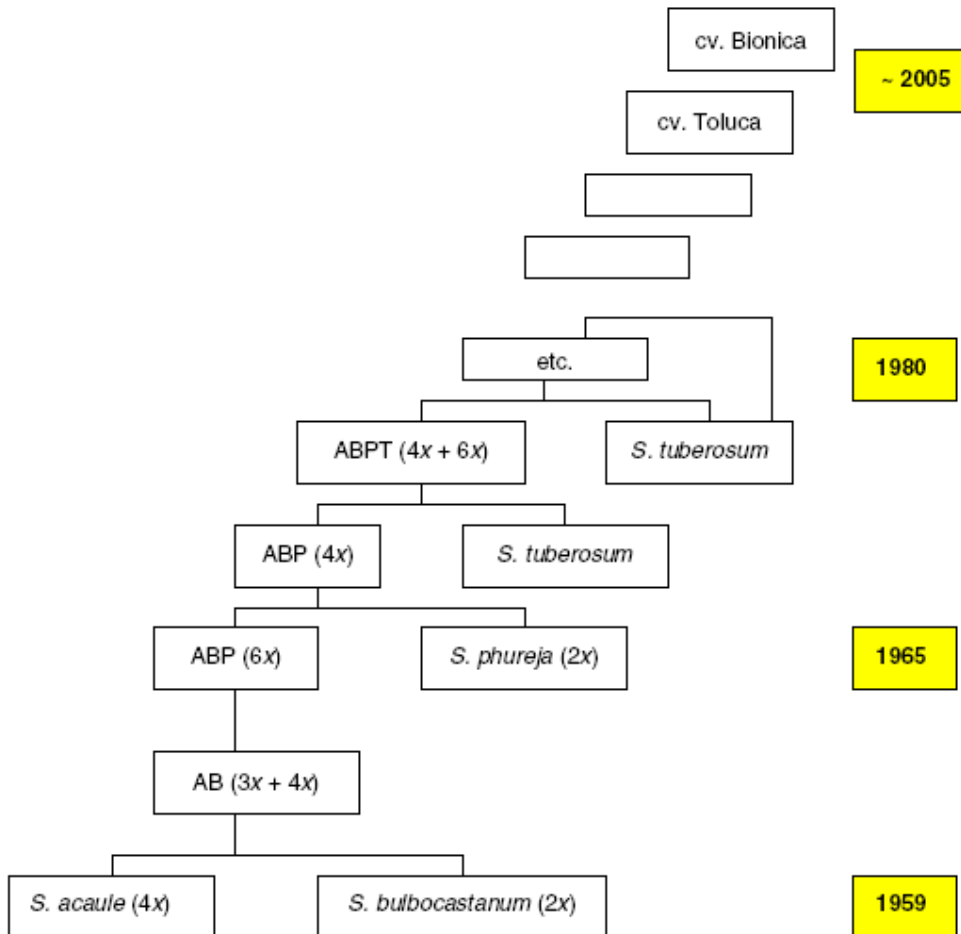


Fig. 3 Scheme of interspecific bridge cross breeding activities with late blight resistant *S. bulbocastanum* at Wageningen University and Research Centre and private breeding companies in the Netherlands. After 46 years the first resistant varieties Bionica and Toluca appeared, containing the single broad spectrum resistance gene *Rpi-blb2*. Note that stacking of *R* genes through this approach would even be more complicated and slow

[www.meijer-potato.com](http://www.meijer-potato.com)

[www.agrico.com](http://www.agrico.com)

### Sarpo Mira

Naast Bionica en Toluca is er vandaag een derde aardappelras op de markt dat een hoge resistentie kent: het ras Sarpo Mira. De basis van dit ras ligt niet in Nederland, maar in Hongarije. Het ras heeft net zoals Bionica en Toluca een lange ontstaansgeschiedenis. De overlevering wil dat er meer dan 40 jaar aan is gewerkt om het huidige resistentieniveau te behalen. Daarbij is als volgt te werk gegaan. Er zijn zoveel mogelijk verschillende vormen van

resistentie, tolerantie en overgevoeligheid bij elkaar gezocht. Vertrekkende vanuit deze genenpool zijn zoveel mogelijk kruisingen gemaakt. De uit het zaad verkregen planten zijn vervolgens in een vroeg stadium bespoten met een zo breed mogelijke mix van *Phytophthora infestans*. Wanneer 95% van de planten is afgestorven, wordt de *Phytophthora* bij de overblijvende planten geneutraliseerd met een fungicide en kunnen deze overblijvende planten volgroeien. Met de verkregen knollen werd dan vervolgens weer verder gewerkt. Tot het moment van het instorten van de communistische regimes. Het instituut waar aan de aardappelen werd gewerkt ging dicht en het is te danken aan de betrokken wetenschappers dat het beste materiaal niet verloren ging.

Een aantal jaren later is bij een totale *Phytophthora*-besmetting in Roemenië het materiaal herontdekt. Het Deense bedrijf Danespo heeft dit materiaal toen onder zijn hoede genomen en de oost-europese wetenschappers een nieuwe basis gegeven om hun werk voort te zetten. Danespo heeft uit het vervolgens verkregen materiaal het ras Sarpo Mira in de markt gezet.

[www.danespo.com](http://www.danespo.com)

## Enkelvoudige resistentiegenen worden door *Phytophthora* gemakkelijk doorbroken

Het is gekend dat *Phytophthora* gemakkelijk door enkelvoudige resistenties heen breekt. De uitgebreide genetische diversiteit binnen *Phytophthora infestans* populaties maakt dat er reeds genotypes aanwezig zijn of ontstaan (zogenoemde mutanten) die het mechanisme van het enige aanwezige resistentiegen kunnen omzeilen. Deze mutanten hebben daardoor een selectievoordeel ten opzichte van de wildtypes en breiden vervolgens snel uit zodat de populatie na korte tijd hoofdzakelijk uit de mutante vormen zal bestaan. Wanneer meerdere resistentiegenen aanwezig zijn bij een aardappelras is het voor de schimmel veel moeilijker om zich tegelijkertijd genetisch aan te passen aan beide resistentiegenen. Zoals al gezegd bezitten de rassen Bionica en Toluca het enkelvoudige resistentiegen *Rpi-blb-2*. In het veld is deze resistentie vandaag nog niet doorbroken. De rassen bieden nog altijd een goede bescherming. Het feit dat de rassen slechts op kleine schaal geteeld worden – voornamelijk door biologische- en hobbytelers – maakt dat de selectiedruk om door de resistentie heen te breken nog gering is. Het is echter bekend dat er al isolaten bestaan die ongevoelig zijn voor het *Rpi-blb-2* –gen. In Nederland is daarom de telers van de rassen Bionica en Toluca op het hart gedrukt om hun gewas nauwlettend in de gaten te houden en zodra ze ook maar enig teken van *Phytophthora*-aantasting zien, meteen het loof te vernietigen. Doen ze dat niet dan zouden ze verantwoordelijk kunnen worden voor de meer grootschalige verspreiding van *Phytophthora*-

isolaten die door de resistentie heen zijn gebroken. En dan zou 40 jaar aan veredelingswerk op relatief korte termijn verloren kunnen gaan.

## Het introduceren van resistentie tegen *Phytophthora infestans* met behulp van genetische modificatie

Sinds een aantal jaren worden er ook door middel van genetische modificatie resistentiegenen in aardappelen geïntroduceerd. Dit gebeurt in de VS (Cornell University), het Verenigd Koninkrijk (Sainsbury Laboratory, John Innes Center), Peru (Centro Internacional de la Papa (CIP)), Duitsland (BASF) en Nederland (Wageningen UR), maar niet in Vlaanderen. Het voordeel van de techniek van genetische modificatie ten opzichte van klassieke veredeling is dat men veel sneller en gericht resistent rassen kan ontwikkelen en ook veel gemakkelijker meerdere resistentiegenen tegelijk kan inbrengen. Dit inbrengen via genetische modificatie kan bovendien zonder verlies van raseigenschappen.

## Genetische modificatie voor resistentie tegen *Phytophthora infestans* in stappen

### **STAP 1: het identificeren van resistentiegenen**

Om aardappelen resistent te maken tegen *Phytophthora* moeten eerst de resistentiegenen verkregen worden. Hiertoe worden wilde verwanten van onze cultuuraardappel uitgezaaid en worden die planten getest op hun resistentie. Dit gebeurt in eerste instantie met een eenvoudige *in vitro* test. Zo zijn duizenden verschillende wilde genotypes getest. Van elk van die planten wordt ook een zogenoemde 'DNA fingerprint' gemaakt – een vingerafdruk van hun DNA. Van de planten die resistentie vertonen wordt vervolgens een bladtest gedaan met enkele specifieke *Phytophthora*-isolaten om de interactie met de schimmel beter te leren kennen. De planten die ook daarbij resistent blijken, worden vervolgens in veldproeven getest. Zo blijft er een kleiner aantal genotypes over die resistent zijn.

Door het DNA van de resistente planten te vergelijken met de planten die niet resistent zijn kan men de gebieden in dat DNA opsporen waarop de resistentie gelegen moet zijn. De verdere zoektocht naar resistentiegenen wordt vandaag vergemakkelijkt door het feit dat het genoom van aardappel op basepaarniveau volledig gesequenced is: de DNA-volgorde is letter per letter bekend. Zo vindt men jaarlijks meerdere nieuwe

resistentiegenen. Vandaag zijn er ongeveer een twintigtal verschillende resistentiegenen bekend en beschikbaar. De geïsoleerde genen worden ook wel cisgenen genoemd omdat ze uit kruisbare soorten afkomstig zijn die ook in de traditionele veredeling gebruikt (kunnen) worden.

### ***STAP 2: het modificeren van aardappellijnen***

Als eenmaal een resistentiegen voorhanden is kan het ingebracht worden in de aardappel. Dit gaat als volgt te werk: in een eerste stap wordt het gen in het DNA van de bodembacterie *Agrobacterium tumefaciens* gebracht. Het wordt daarbij ingebouwd in een stuk DNA dat de bacterie van nature overdraagt naar het DNA van de plant wanneer de bacterie de plant infecteert.

Kleine stukjes aardappelweefsel worden in een kweekschal gebracht waarin een voedingsbodem aanwezig is waarop de plant kan groeien. Vervolgens wordt de gemodificeerde *Agrobacterium* op dit aardappelweefsel aangebracht. De bacterie infecteert het weefsel en draagt de resistentiegen over naar het DNA van de plant. Vervolgens kan vanuit het aardappelweefsel weer een nieuw plantje geregenereerd worden. Dit gebeurt door aan de voedingsbodem verschillende plantenhormonen toe te voegen die het weefsel weer aanzetten tot het aanmaken van wortels en groen bovengronds plantenweefsel.

Niet alle cellen worden geïnfecteerd door *Agrobacterium* zodat het gewenste DNA-fragment niet in alle cellen van het plantenweefsel aanwezig is. Daarom moet je plantjes selecteren die het DNA daadwerkelijk hebben opgenomen. Dat kun je op twee manieren doen. De eerste manier is door aan het resistentiegen nog een ander gen te koppelen: een zogenoemde selectiemerker. Dit kan bijvoorbeeld een antibioticumresistentiegen zijn of een herbicidetolerantie. Door nu het antibioticum of het herbicide aan de voedingsbodem toe te voegen, zorg je ervoor dat alleen die plantjes overleven die het DNA daadwerkelijk hebben opgenomen. Dit is een eenvoudige manier van selecteren.

De selectiemerkers zijn vaak afkomstig van bacteriën of van planten waarmee de aardappel van nature niet kan kruisen. Ze zijn dus soortvreemd. Planten waarin via genetische modificatie soortvreemde genen zijn binnengebracht, noemt men ook wel 'transgeen'.

Bij de tweede selectiemethode wordt er geen selectiemerker aan het over te dragen DNA toegevoegd. Alle geregenereerde plantjes worden opgegroeid, ook degene die geen DNA hebben opgenomen. Vervolgens wordt van alle opgegroeide plantjes DNA

afgenomen en wordt mbv. een genetische test op basis van PCR<sup>1</sup> bepaald of het plantje het gewenste DNA heeft opgenomen. Deze selectiemethode is een stuk ingewikkelder en kost veel meer tijd. Planten die het DNA niet hebben opgenomen worden weggegooid.

De resistente planten die geen selectiemerker hebben, bevatten alleen via genetische modificatie ingebracht DNA afkomstig uit aardappelen of planten waarmee de aardappel van nature kan kruisen. Dergelijke planten noemt men ook wel 'cisgeen'. Cisgene planten zijn in hoge mate vergelijkbaar met planten die via klassieke veredeling verkregen kunnen worden. Enkel de technologie waarmee het DNA is binnengebracht, verschilt.

### ***STAP 3: het testen van de plantjes in een serre***

De eerste groeistadia van de genetisch gemodificeerde aardappelen worden meestal uitgevoerd in een plantenkweekkamer. Wanneer de planten wat groter zijn worden ze overgebracht naar een serre. Daar kunnen ze in een pot gekweekt worden of in de volle grond. De kweek in de serre heeft verschillende doelen. In eerste instantie gaat het vooral om het achterhalen of de gewenste eigenschappen aanwezig zijn. De *Phytophthora*-resistentie is daarbij de allereerste belangrijke eigenschap. Enkel met planten die in een eenvoudige bladtest resistentie vertonen wordt verder gewerkt. Daarnaast gaat het om het controleren van de raseigenschappen. Zijn alle belangrijke kenmerken nog aanwezig? Raseigenschappen kunnen verloren gaan als gevolg van drie fenomenen: (1) 'insertiemutagenese', (2) 'pleiotropie', of (3) 'somaklonale variatie'.

Met insertiemutagenese wordt een fout bedoeld die ontstaat als gevolg van het feit dat het extra stuk DNA midden in een bestaand gen landt en daardoor de werking van dit bestaande gen verstoort. Aardappel is tetraploïd, wat wil zeggen dat het van elk chromosoom 4 exemplaren heeft (4 'homologen'). Het ingebrachte DNA landt in één van die vier chromosomen, wat betekent dat als de modificatie al leidt tot een mutatie, dit maar in één van de vier genen zal zijn aanwezig op de vier homologe chromosomen. De overige drie genen blijven dus intact. Een mutatie als gevolg van insertie van DNA leidt daarom zowat nooit tot een waarneembare wijziging in de eigenschappen van de aardappel.

Pleiotropie is het fenomeen dat er onverwachte en ongewenste effecten kunnen optreden als gevolg van het feit dat het extra stuk DNA op een van tevoren niet bekende

---

<sup>1</sup> PCR = Polymerase Chain Reaction, polymerase kettingreactie

plaats in het DNA van de plant landt. Het kan bijvoorbeeld de werking van in de buurt gelegen genen verstoren.

Somaklonale variatie is het ontstaan van fenotypische (=waarneembare) afwijkingen ten opzichte van de aardappel waarvan hij afgeleid is als gevolg van het door *in vitro* cultuur brengen en opnieuw regenereren van de aardappel. Dit laatste fenomeen staat dus geheel los van de techniek van genetische modificatie en treedt ook op bij gewone *in vitro* vermeerdering.

Het komt er in de serre dan ook op aan om een strenge selectie toe te passen en enkel die planten te selecteren die zogenoemd 'true-to-type' zijn, maw. dat ze nog alle belangrijke raskenmerken bezitten. Met de planten die resistentie vertonen èn true-to-type zijn wordt verder gewerkt. Daarmee worden dan ook bladtoetsen uitgevoerd met echte *Phytophthora*-isolaten. En planten die ook daar goed in scoren, komen in principe in aanmerking voor testen in het veld.

## De teelt van conventioneel resistente rassen

Aardappellrassen verschillen in hun vatbaarheid voor *Phytophthora*. Rassen zoals Bintje en Nicola zijn erg vatbaar voor de ziekte. Vroege rassen kunnen door hun korte groeicyclus eventueel ontsnappen aan de grootste *Phytophthora*-druk. Slechts enkele rassen zoals Bionica, Toluca en Sarpo Mira bezitten een echte resistentie gebaseerd op 1 of meerdere R-genen. De resistentiegenen afkomstig van *Solanum demissum* aanwezig in sommige rassen zijn vaak doorbroken en daarom niet meer te gebruiken. Bionica, Toluca en Sarpo Mira worden respectievelijk door de Nederlandse bedrijven Meijer en Agrico en het Deense Danespo op de markt gebracht. Bionica en Toluca worden enkel geteeld voor de versmarkt. Bionica en Toluca worden voornamelijk in de bioteelt toegepast. De aardappelen zijn sinds enkele jaren op de markt en in 2009 bleek hun resistentie in het veld nog altijd goed te zijn. Bionica wordt in België via AVEVE verkocht voor de hobbytelers. In 2010 heeft AVEVE Bionica pootgoed verkocht aan hobbytelers en dat heeft zich in de praktijk vertaald naar ruim 10 hectare Bionica teelt. Dit is natuurlijk slechts een figuurlijke druppel op de gloeiende plaat, maar de hobbyteelt wordt van oudsher beschouwd als een potentiële bron voor de verspreiding van *Phytophthora* naar de commerciële teelt, omdat in de hobbyteelt *Phytophthora* nauwelijks bestreden wordt. Zo kan een heel kleine hoeveelheid Bionica toch een impact hebben op de ziektedruk.

Sarpo Mira wordt vanwege zijn wit/gele vleeskleur, wat bloemige kookvorm en zijn minder gladde knoluitzicht (bleek rode schil, wat bonkige vorm) door de consument nog niet erg

gewaardeerd. De aardappel is wel goed geschikt gebleken voor frites en voor vlokken, granulaat en puree. McCain gebruikt Sarpo Mira exclusief voor hun bio-frites.

[www.avevewinkels.be](http://www.avevewinkels.be)

## Duurzame resistentie

Enkelvoudige resistenties tegen *Phytophthora* zijn niet duurzaam. *Phytophthora* breekt er vroeg of laat doorheen en dan verliezen de rassen met die enkelvoudige resistenties een groot deel van hun waarde. De combinatie van twee verschillende resistentiegenen is al veel duurzamer. Het wordt dan niet twee keer, maar vele keren zo moeilijk voor *Phytophthora* om dan door de resistentie heen te breken. Een drievoudige resistentie is nóg weer vele malen duurzamer.

De meest duurzame resistentie wordt verkregen wanneer aardappellrassen met verschillende meervoudige resistenties, in ruimte en in tijd afgewisseld zouden worden. Wetenschappers zijn ervan overtuigd dat in een dergelijk scenario, aangevuld met een beetje spuiten, *Phytophthora*-problemen tot het verleden zouden moeten behoren, omdat de *Phytophthora* in dat geval geen kans krijgt om zich aan te passen.

## De Fortuna-aardappel van BASF

BASF is het meest gevorderd met de ontwikkeling van genetisch gewijzigde, *Phytophthora*-resistente aardappelen. Zij hebben de 'Fortuna'-aardappel gemaakt. Deze aardappel is zowat rijp voor de markt. De aardappel bevat twee resistentiegenen, te weten *Rpi-blb-1*, en *Rpi-blb-2*. De combinatie van deze twee resistentiegenen zou moeten betekenen dat de resistentie van deze aardappel een stuk duurzamer zou moeten zijn dan die van de rassen Bionica en Toluca. De Fortuna-aardappel bevat daarnaast ook nog een selectiemerker in de vorm van een gemuteerd AHAS-gen. Dit gemuteerde AHAS-gen geeft onder meer tolerantie tegen sulfonyl-ureum gebaseerde herbiciden. BASF heeft de twee resistentiegenen in-gelicenseerd van een bedrijf, dat de oorspronkelijke eigendomsrechten heeft op het gebruik van deze genen.

BASF doet hierover zelf geen officiële mededelingen, maar volgens verschillende bronnen zou de Fortuna-aardappel afgeleid zijn van het ras Agria, een ras dat in Europa op heel wat plaatsen grootschalig verbouwd wordt, en goede eigenschappen heeft voor verwerking tot friet.

[http://www.basf.com/group/corporate/en\\_GB/function/conversions:/publish/content/products-and-industries/biotechnology/images/Fortuna\\_VC.pdf](http://www.basf.com/group/corporate/en_GB/function/conversions:/publish/content/products-and-industries/biotechnology/images/Fortuna_VC.pdf)

## Het cisgenese-project DuRPh

In Nederland heeft men in 2006 het DuRPh-project opgestart. DuRPh staat voor **Duurzame Resistentie tegen *Phytophthora***. Dit is een 10-jarig project dat gefinancierd wordt door de Nederlandse overheid en tot doel heeft resistentiegenen te identificeren en te karakteriseren, genetisch gewijzigde aardappellijnen te maken en te testen, en hierover te communiceren met een breed doelpubliek. Het uiteindelijke doel is tot een “proof of principle” te komen met betrekking tot duurzame resistentie tegen deze ziekte. Het project is opgezet vanuit een echte duurzaamheidsbenadering en houdt rekening met economische aspecten, zowel als met ecologische en sociale aspecten. Wageningen UR is de initiatiefnemer en de uitvoerder van het DuRPh-project.

In het DuRPh-project worden genetisch gewijzigde aardappelen gemaakt met een specifieke achterliggende gedachte. Men gebruikt weliswaar de techniek van genetische modificatie, en het eindresultaat valt nog altijd onder de GGO-wetgeving, maar de planten die gemaakt worden leunen zo dicht als überhaupt mogelijk is aan tegen planten die ook via conventionele veredeling verkregen kunnen worden. Men noemt dit *cisgenese*, en dit betekent in de praktijk dat:

- (1) De resistentiegenen afkomstig zijn uit *Solanaceae* waarmee de aardappel van nature kan kruisen.
- (2) Er niet gesleuteld wordt aan de resistentiegenen. Ze worden met hun natuurlijke regulatiesignalen ingebracht.
- (3) In de finale lijnen geen selectiemerkers aanwezig zullen zijn, alleen cisgenen.

In de eerste ontwikkelingsfasen werkt men nog met constructen waarin wel een merker aanwezig is, gewoon omdat dit gemakkelijker werkt en minder tijd vergt, en men op die manier sneller inzicht kan verwerven in welke (combinaties van) genen een goede en duurzame resistentie geven.

Wageningen UR voert sinds 2006 kleinschalige veldproeven uit met genetisch gewijzigde *Phytophthora*-resistente aardappellijnen op verschillende locaties in Nederland. In deze veldproeven worden de verschillende lijnen die in het serre-onderzoek een (goede) resistentie vertonen, aan een eerste realiteitstest onderworpen. In de loop van de jaren worden zo verschillende constructen en lijnen getest. Er zijn aardappelen bij met enkelvoudige resistenties, dubbele resistenties, drievoudige resistenties, en lijnen met (transgeen) en zonder selectiemerker (cisgeen).

[www.durph.nl](http://www.durph.nl)

## Cisgenese is onderwerp van regulatoire discussies op EU-niveau

Cisgenese is genetische modificatie, dat lijkt geen twijfel. Er is echter discussie over de vraag of cisgenese wel onder de Europese GGO-regelgeving moet blijven vallen of vrijgesteld zou kunnen worden. De bestaande wetgeving kent al een aantal uitzonderingen. Klassieke mutagenese, bijvoorbeeld, valt onder de definitie van genetische modificatie, maar is vrijgesteld van de Europese GGO-regelgeving. Een technische werkgroep beraadt zich op de vraag of er gegronde redenen zijn om cisgenese onder de GGO-regelgeving te handhaven of niet. De werkgroep kijkt niet alleen naar cisgenese, maar ook nog naar een aantal andere moderne manieren om wijzigingen in het DNA aan te brengen, waaronder 'reverse breeding', en 'targeted DNA repair'.

## Genetisch gewijzigde *Phytophthora*-resistente aardappelen vormen geen bedreiging voor het leefmilieu

Genetisch gewijzigde planten mogen geen negatieve gevolgen hebben voor het leefmilieu, zoals bijvoorbeeld het verdringen van bestaande soorten in de natuur of het verstoren van delicate natuurlijke evenwichten. Genetisch gewijzigde *Phytophthora*-resistente aardappelen bezitten resistentiegenen die van nature voorkomen in wilde, knoldragende *Solanaceae*. Dezelfde of vergelijkbare genen zijn ook aanwezig in conventioneel veredelde *Phytophthora*-resistente aardappelen. De genen in de genetisch gewijzigde aardappellijnen zijn daarom net zo milieuveilig als diezelfde genen in de conventioneel veredelde rassen en diezelfde genen in de wilde verwanten. Is daarmee de kous af? Niet helemaal. Want het is niet helemaal uitgesloten dat de genetische modificatie leidt tot onverwachte fenomenen die een effect hebben op de overleving van de aardappelplant in de natuur, of leidt tot andere onverwachte wijzigingen in eigenschappen van de plant. Om die reden vinden er bij het vinden van geschikte genetisch gemodificeerde lijnen strenge selecties plaats, met het doel enkel die lijnen te selecteren die de correcte raseigenschappen behouden hebben. In veldproeven worden het uiterlijk en het gedrag van de planten ook uitvoerig bestudeerd, om eventuele afwijkingen op te sporen, en na te gaan of eventuele afwijkingen ongewenste gevolgen hebben. Planten met ongewenste eigenschappen zullen niet op de markt worden gebracht.

De aardappel komt in Europa niet als wilde plant voor. Bovendien heeft de aardappel in Europa geen familieleden waarmee ze kan kruisen. Zwarte nachtschade staat fylogenetisch het dichtst bij aardappel, maar ook daarmee kan de aardappel niet kruisen. De cultuuraardappel is bovendien een sterk gedomesticeerde plant die zich hier niet spontaan in de natuur kan

vestigen. Ze bezit te weinig concurrentiekracht ten opzichte andere wilde planten. Dit betekent concreet dat noch de genetisch gemodificeerde aardappelen zelf, noch de genetisch gewijzigde eigenschap zich in ons leefmilieu kunnen vestigen. De aardappel zal enkel als opslagplant voor kunnen komen op percelen waar ze zijn geteeld, en in grond afkomstig van percelen waarop ze geteeld zijn. Maar dat is telkens een tijdelijke aanwezigheid.

## De voedselveiligheid van genetisch gewijzigde *Phytophthora*-resistente aardappelen

Genetisch gewijzigde *Phytophthora*-resistente aardappelen bevatten dezelfde of vergelijkbare resistentiegenen als traditionele *Phytophthora*-resistente aardappelen. Een concreet voorbeeld: de genetisch gewijzigde Fortuna-aardappel van BASF en de via conventionele veredeling verkregen aardappelrassen Bionica en Toluca bevatten alledrie hetzelfde *Rpi-blb-2* –gen. Bij de genetisch gewijzigde aardappelen moet aangetoond worden dat het genproduct dat door het resistentiegen wordt aangemaakt, veilig is. Er moet aangetoond worden dat het noch toxisch is, noch allergische reacties oproept. Voor hetzelfde gen in een conventioneel veredeld ras zoals Bionica of Toluca hoeft dit niet te gebeuren. Die mogen zonder verdere voedselveiligheidstoets op de markt gebracht worden. En dat ondanks het feit dat het *Rpi-blb2*-gen in deze planten omgeven is door honderden genen afkomstig uit de wilde soort.

Zoals ook al eerder aangegeven is het niet uitgesloten dat de genetische modificatie kan leiden tot onverwachte neveneffecten. Insectiemutagenese, pleiotropie en somaklonale variatie zijn genoemd als mogelijke oorzaken van dergelijke neveneffecten. Om die reden moet een genetisch gewijzigde *Phytophthora*-resistente aardappel aanvullende testen ondergaan. Zo moet onder meer de samenstelling van de aardappel vergeleken worden met die van conventionele aardappelen. Daarbij wordt van de belangrijkste componenten van de aardappel de hoeveelheid gemeten en vergeleken. De OESO heeft bepaald welke stoffen allemaal in de analyse meegenomen moeten worden. Aardappel bevat zelf van nature de giftige glyco-alkaloïden. Hun aanwezigheid maakt dat je aardappelen moet schillen voordat je ze veilig kunt eten. Aardappel bevat daarnaast stoffen die onze verteringsenzymen blokkeren. Van rauwe aardappelen krijg je dan ook buikpijn, en om dat te vermijden verhitten we aardappelen voordat we ze eten. Op de hoeveelheid van dit soort stoffen wordt in de vereiste analyse heel goed gelet, want je wilt koste wat kost voorkomen dat je aardappelen op de markt brengt die te veel van die gevaarlijke stoffen in zich bergen. De hoeveelheid glyco-alkaloïden wordt overigens bij elk nieuw ras gecontroleerd voordat het op de markt wordt gebracht, of het nu genetisch gewijzigd is of niet. In Nederland en Zweden wordt een totale glycoalkaloïde-gehalte van 200 mg/kg als bovenste veiligheidsgrens gehanteerd. Andere EU-landen hebben geen normen voor glycoalkoloiden vastgelegd.

Mocht de analyse van de samenstelling van de genetisch gewijzigde aardappel aantonen dat er een onverwachte afwijking is in hoeveelheid van bepaalde stoffen, dan moeten aanvullende proeven worden uitgevoerd. Meestal in de vorm van een 90-dagen voedingsproef in ratten.

*OECD, Consensus Document on the Biology of Solanum tuberosum subspecies tuberosum (potato)*

## **Genetisch gewijzigde *Phytophthora*-resistente aardappelen zijn voorlopig nog niet op de markt**

De genetisch gewijzigde *Phytophthora*-resistente Fortuna-aardappel van BASF bevindt zich in een vergevorderd stadium maar is nog niet op de markt. BASF moet hiervoor eerst nog een marktaanvraag indienen bij de Europese commissie. En als eenmaal dat dossier is ingediend, duurt het nog enkele jaren voordat dit door de procedure heen is. Het is voor een deel koffiedik kijken, maar naar verwachting zal het minstens tot 2013 duren voordat er een genetisch gewijzigde *Phytophthora*-resistente aardappel op de markt kan zijn. Alle andere lijnen die in ontwikkeling zijn, zijn minder ver gevorderd dan de Fortuna-aardappel en zullen nog langer op zich laten wachten.