

# **Nieuwe technieken in de plantenbiotechnologie**

**COGEM advies en signalering CGM/061024-02**

## **Commissie Genetische Modificatie (COGEM)**

De COGEM heeft tot taak de regering te adviseren over de risicoaspecten van genetisch gemodificeerde organismen en te signaleren over ethische en maatschappelijke aspecten van genetische modificatie (Wet milieubeheer §2.3).



## Samenvatting

De plantenbiotechnologie biedt de veredeling grote kansen. Nieuwe technieken worden ontwikkeld die het mogelijk maken om gewenste eigenschappen sneller te selecteren of te induceren. Hierbij houdt het Nederlandse bedrijfsleven zich grotendeels afzijdig van de genetische modificatie van planten. De afkeer van de consument, de ingewikkelde regelgeving en de hoge kosten gemoeid met de toelating van gg-gewassen en hun producten maken genetische modificatie een weinig aantrekkelijk alternatief voor conventionele veredelingsmethoden. Echter met het voortschrijden van de techniek wordt het onderscheid tussen genetische modificatie en andere plantenbiotechnologische technieken steeds kleiner. Daarmee ontgroeien de voortschrijdende technologische ontwikkelingen ook de kaders van de ggo-regelgeving. Onduidelijk is soms of de producten van sommige technieken onder de ggo-regelgeving vallen.

Als gevolg hiervan begint tussen de overheid en het bedrijfsleven als ontwikkelaar van nieuwe technieken in de plantenbiotechnologie een impasse te ontstaan. Het bedrijfsleven wil sommige innovaties alleen verder ontwikkelen als ze inzicht heeft of deze al dan niet onder de ggo-regelgeving zullen vallen. De overheid is gebonden aan de kaders van de EU-regelgeving en stelt alleen in het geval van een concrete aanvraag een oordeel te kunnen geven of de toepassing onder de regelgeving valt. Hierdoor ontstaat een situatie waarbij beide partijen op elkaar gaan wachten.

### *Advies*

In dit advies dat deels een signalerend karakter heeft, worden een zestal nieuwe technieken behandeld; 'reverse breeding', agroïnoculatie, enten op genetisch gemodificeerde onderstammen, geninactivering door DNA-methylering, de toepassing van oligonucleotiden, en gerichte mutagenese met homologe recombinatie. Deze technieken zijn gekozen omdat ze zich in het voorstadium van commerciële toepassing bevinden of inzicht geven in de bredere problematiek. Bij verschillende van de besproken technieken is het de vraag of ze als genetische modificatie moeten worden beschouwd en of hun producten als ggo moeten worden gekarakteriseerd. Hierbij kan een voortschrijdende schaal worden onderscheiden.

De producten van sommige technieken zoals de nakomelingen bij 'reverse breeding' bevatten geen nieuwe eigenschappen, toegevoegde sequenties mutaties of andere veranderingen. Bij epigenetische mutanten zijn ook geen sequentieveranderingen in het genoom aangebracht maar is wel sprake van overerfbare effecten. Bij enten kan er sprake zijn van de afwezigheid van transgene sequenties maar aanwezigheid van transgene eiwitten of andere transgene moleculen of geïnduceerde effecten. Andere producten, zoals bij de

toepassing van mutagentia gekoppeld aan oligonucleotiden, bevatten wel mutaties in het genoom maar zijn op vergelijkbare wijze geproduceerd als van de regelgeving vrijgestelde organismen. En als laatste zijn er organismen die genetisch gemodificeerd zijn maar waarbij van een modificatietechniek gebruik is gemaakt, die veel van de huidige technisch-wetenschappelijke bezwaren wegneemt.

De Europese regelgeving is gebaseerd op het principe dat als bij de productie van een organisme gebruik is gemaakt van recombinant DNA technieken, het organisme een ggo is met veranderde genetische eigenschappen en dat dit organisme daarom onder de ggo-regelgeving valt. Hierbij is de achterliggende gedachte dat het proces van genetische modificatie inherent onveilig is en risico's met zich meebrengt. Met de voortschrijdende wetenschappelijke ontwikkelingen en technieken is het echter mogelijk om in een productieproces recombinant DNA-technieken of genetische modificatie te gebruiken waarbij echter de resulterende plant of het organisme geen toegevoegde sequenties of andere wijzigingen bevat of tot expressie brengt. Planten die met behulp van 'reverse breeding' zijn geproduceerd zijn hiervan een voorbeeld. De COGEM is op technisch-wetenschappelijke gronden van mening dat dergelijke planten als niet-ggo beschouwd moeten worden. Indien de huidige regelgeving dit onmogelijk maakt is de COGEM van mening dat vrijstelling van de ggo-regelgeving op zijn plaats is.

De COGEM is verder van mening dat nakomelingen van ge-agroïnoculeerde planten in principe geen ggo's zijn. Echter op dit moment is niet volledig uit te sluiten dat na agroïnoculatie nakomelingen onbedoeld transgene sequenties bevatten. De COGEM laat hiernaar een nader onderzoek uitvoeren. Naar verwachting zullen de resultaten van dit onderzoek begin 2007 beschikbaar komen.

Het is nog te vroeg om uitspraken te doen over epigenetische toepassingen en eventuele milieurisico's. Op dit moment is nog onduidelijk hoe stabiel epigenetische veranderingen zijn en wat het achterliggende mechanisme van overerving is. Directe toepassingen zijn ook nog niet te verwachten. Verder is het onduidelijk of epigenetische mutanten onder het juridische kader van de ggo-regelgeving vallen.

Of niet gemodificeerde bovenstam geënt op gg-onderstammen en hun producten onder de ggo-regelgeving vallen is hoofdzakelijk een politiek-juridische vraag. Wel merkt de COGEM op dat niet gesteld kan worden dat er per definitie geen risico's voor mens en milieu verbonden zijn aan bovenstam(producten) geënt op gg-onderstammen. en beveelt de COGEM een casusspecifieke benadering aan.

De COGEM is van mening dat gerichte mutagenese met behulp van oligonucleotiden een vorm is van 'klassieke' mutagenese en daarom vrijgesteld kan worden van ggo-wet- en regelgeving.

Gerichte integratie van transgenen via homologe recombinatie in de planten die met behulp van deze techniek worden geproduceerd, vallen onder de noemer van genetische modificatie waardoor er altijd een milieurisicoanalyse zal moeten plaatsvinden wanneer een transgen wordt ingebracht.

### *Signalering*

De COGEM signaleert dat de ontwikkeling van nieuwe technieken, meer duidelijkheid en wellicht ook nieuwe interpretaties van de huidige wet- en regelgeving over ggo's vergt. De scheidingslijn tussen wat wel en niet een ggo is, wordt steeds moeilijker vast te stellen. Of bepaalde technieken wel of niet onder de ggo-regelgeving vallen, is hoofdzakelijk een juridisch-politieke keus. Naast de technisch-wetenschappelijke argumenten kunnen daarbij ook ethisch-maatschappelijke aspecten een rol spelen

De COGEM benadrukt het economische belang van het tijdig maken van beleidskeuzes in verband met nieuwe technieken in de plantenbiotechnologie omdat de beslissing of bepaalde technieken wel of niet onder de regelgeving vallen belangrijke economische gevolgen heeft.

De COGEM is zich bewust van het Europese karakter van de wet- en regelgeving over ggo's en van de waarborgen van co-existentie en keuzevrijheid. Bij besluiten om nieuwe technieken wel of niet onder de ggo-regelgeving te brengen, zal rekening gehouden moeten worden met deze Europese dimensie.

De COGEM wijst erop dat nieuwe technische ontwikkelingen de handhaafbaarheid van de Europese ggo-regelgeving bemoeilijken. Bij import zal het steeds lastiger blijken om vermenging met niet aangemelde ggo's te ontdekken. Dit zal de vraag oproepen hoe de keuzevrijheid van de consument gegarandeerd kan worden en of de verplichte etikettering van ggo's hiervoor voldoende waarborgen biedt.

In haar recente signalering<sup>1</sup> over de ethische en maatschappelijke aspecten van cisgenese heeft de COGEM naast economische, ook andere aandachtspunten opgesomd in het geval de overheid ervoor kiest om mogelijkheden te creëren voor vereenvoudigde toelatingsprocedures. Deze aandachtspunten kunnen ook van belang zijn bij de besluitvorming of nieuwe technieken en hun producten onder de ggo-regelgeving vallen. De COGEM wijst erop dat haar advies om sommige technieken niet onder de ggo-regelgeving te laten vallen op technisch-

wetenschappelijke gronden is gebaseerd. Niet iedereen in de maatschappij zal deze opinie delen. Zij kunnen van mening zijn dat hun keuzevrijheid beperkt wordt als producten waarbij dergelijke technieken in het productieproces gebruikt zijn niet als ggo worden aangemerkt. Deze argumentatie leeft ondermeer sterk in de biologische landbouw, die een procesgestuurde en gecontroleerde vorm van landbouw nastreeft. Onduidelijk is nog wat de positie en mening van de consument is. Bij besluitvorming of de producten van bepaalde technieken al dan niet onder de ggo-regelgeving vallen, kan een punt van overweging zijn wat de consument verwacht met betrekking tot etikettering en dergelijke. Een consumentenonderzoek zou hierover wellicht meer duidelijkheid kunnen geven.

## **Inhoudsopgave**

<b>1. Inleiding</b>	<b>9</b>
<b>2. Wet en regelgeving</b>	<b>11</b>
<b>2. Reverse Breeding</b>	<b>13</b>
<b>3. Agroïnoculatie</b>	<b>15</b>
<b>4. Geninactivering door DNA-methylering</b>	<b>17</b>
<b>5. Enten op genetisch gemodificeerde onderstammen</b>	<b>21</b>
<b>6. Oligonucleotiden</b>	<b>25</b>
<b>7. Gerichte mutagenese met homologe recombinitie</b>	<b>27</b>
<b>8. Conclusies</b>	<b>31</b>
<b>Referenties</b>	<b>39</b>





## 1. Inleiding

In de plantenveredeling worden rassen gekweekt en geselecteerd, die gewenste eigenschappen bezitten. Deze eigenschappen lopen uiteen van een hogere opbrengst of verminderde gevoeligheid voor ziekten en plagen tot een verbeterde kwaliteit van het product. Om dit te bereiken worden planten met elkaar gekruist en van hun nakomelingen wordt onderzocht of zij beter presteren dan de al bestaande rassen. Veredeling is een langdurig proces. De tijd die nodig is van kruising tot aan de introductie van een nieuw ras bedraagt tenminste acht tot tien jaar.

Plantenbiotechnologie heeft een enorme stimulans voor de plantenveredeling betekend. Door de toepassing van nieuwe technieken afkomstig uit de biotechnologie is de plantenveredeling de afgelopen decennia sterk veranderd. Het gebruik van bijvoorbeeld genetische markers voor selectie is niet meer weg te denken.

Genetische modificatie is slechts een klein gebied binnen de plantenbiotechnologie. De strenge regelgeving, de hoge kosten verbonden aan het opbouwen van toelatingsdossiers van ggo's en de afwijzende houding van de Europese consument tegenover genetisch gemodificeerd (gg-) voedsel zijn de redenen dat Nederlandse veredelingsbedrijven weinig interesse hebben voor genetische modificatietechnieken. Ze richten zich veeleer op technieken die de klassieke veredelingsprocessen efficiënter laten verlopen. Sommige van deze technieken bevinden zich echter op het snijvlak van wat wel of niet als genetische modificatie kan worden beschouwd.

Met dit advies c.q. signalering wil de COGEM de overheid attent maken op de recente technische ontwikkelingen in de plantenbiotechnologie. Ze wil een overzicht geven van de laatste stand van zaken op dit terrein door inzicht te bieden in de mogelijke toepassingen van bepaalde technieken, eventuele risico's en de onduidelijkheden in de regelgeving.

In dit rapport wordt een zestal min of meer nieuwe toepassingen behandeld die binnen afzienbare termijn commerciële toepassing zullen bereiken. Bij deze toepassingen is een glijdende schaal te onderkennen van producten die duidelijk niet transgeen zijn omdat ze geen toevoegingen, veranderingen of mutaties in het genoom, noch veranderde eigenschappen bevatten, tot planten die duidelijk genetisch gemodificeerd zijn. Echter elk van deze nieuwe technieken roept vragen op over de interpretatie van de ggo-regelgeving. De beantwoording van deze vragen is essentieel voor de verdere ontwikkeling van deze technieken. De COGEM beoogt met dit rapport een aanzet te geven tot oplossing van deze problematiek.



## 2. Wet en regelgeving

In de EU Richtlijn 2001/18 “Inzake de doelbewuste introductie van genetisch gemodificeerde organismen in het milieu”<sup>2</sup> wordt een ggo gedefinieerd als: *“een organisme, met uitzondering van menselijke wezens, waarvan het genetische materiaal veranderd is op een wijze welke van nature door voortplanting en/of natuurlijke recombinatie niet mogelijk is”*.

Verder staat in deze richtlijn *“volgens deze definitie: a) vindt in elk geval genetische modificatie plaats indien een van de in bijlage I A, deel 1, genoemde technieken wordt toegepast”*

De in deze bijlage genoemde technieken zijn: *“1) recombinant-nucleïnezuur-technieken waarbij nieuwe combinaties van genetisch materiaal worden gevormd door de invoering van ongeacht op welke wijze buiten een organisme vervaardigde nucleïnezuurmoleculen in een virus, bacterieel plasmide of ander vectorsysteem en de opneming daarvan in een gastheerorganisme waarin ze van nature niet voorkomen maar waarin ze blijvend vermenigvuldigd kunnen worden; 2). technieken met rechtstreekse inbrenging in een organisme van erfelijk materiaal dat buiten het organisme vervaardigd is, waaronder micro-injectie, macro-injectie en micro-inkapseling; en 3) celfusie (met inbegrip van protoplastfusie) of hybridisatietechnieken waarbij levende cellen met nieuwe combinaties van erfelijk genetisch materiaal worden gevormd door de fusie van twee of meer cellen met gebruikmaking van methoden die van nature niet voorkomen.”*

Deze EU richtlijn is één op één geïmplementeerd in de wetgeving van de EU lidstaten en is leidend voor de bepaling welke technieken, organismen en producten onder de ggo-regelgeving vallen. Hierbij kunnen echter twee interpretaties worden gehanteerd. Immers enerzijds wordt gesteld dat een ggo veranderd genetisch materiaal moet bevatten en anderzijds wordt gesteld dat er sprake is van genetische modificatie indien bepaalde technieken worden gehanteerd. Bij de definitie van een ggo wordt een productbenadering gehanteerd (het eindproduct is gemodificeerd), terwijl bij de definitie op basis van technieken een procesbenadering gehanteerd wordt (bij het productieproces is gebruik gemaakt van bepaalde technieken). Ten tijde van het opstellen van de wetgeving vormde dit geen probleem, toepassing van de vermelde technieken resulteerde in een organisme met veranderd genetisch materiaal. Echter, - zoals in dit rapport beschreven wordt -, is het met het voortschrijden van de technologie nu mogelijk om gebruik te maken van recombinant DNA technieken zonder dat een organisme ontstaat met veranderingen aan het genoom.

Hierdoor is het dilemma ontstaan welke interpretatie gehanteerd moet worden. Valt een organisme dat geen genomische veranderingen bevat en daarmee op geen enkele wijze te onderscheiden valt van een niet-gemodificeerd organisme onder de ggo-regelgeving? Of moet de procesbenadering gehanteerd worden, met als achterliggende gedachte dat aan de toepassing van recombinant DNA technieken inherent veiligheidsrisico's zijn verbonden die in producten tot uiting komen en waarover de consument tenminste geïnformeerd moet worden. Bij deze vraagstellingen spelen naast juridische, technisch-wetenschappelijke en veiligheidsargumenten ook ethisch-maatschappelijke overwegingen.

## 2. Reverse Breeding

### *Kenmerken reverse breeding*

De techniek van 'reverse breeding' is ontwikkeld door een veredelingsbedrijf.<sup>3</sup> Het doel van reverse breeding is om ouderlijnen te creëren van gewenste hybride (niet genetisch gemodificeerde) lijnen. Om dit te bewerkstelligen worden uit de heterozygote plant, homozygote lijnen gecreëerd.

Dit gebeurt door in de heterozygote lijn (de hybride) een gen in te bouwen dat de recombinatie in de meiose onderdrukt. Hierdoor zullen de haploïde geslachtscellen gehele niet-gerecombineerde chromosomen bevatten. Deze geslachtscellen worden vervolgens gebruikt om planten te produceren. De planten die de transgene sequentie bevatten worden uitgeselecteerd en alleen de niet genetisch gemodificeerde planten worden gebruikt.

Met behulp van RNAi kunnen genen worden stilgelegd die voor recombinatie in de meiose zorgen. Er zijn verschillende genen betrokken bij de meiotische recombinatie. Genen die uitgeschakeld kunnen worden zijn *asyl* of *sds*, die regelen dat de homologe chromosomen paren in de eerste fase van de meiose. Daarnaast kan het gen *spo11-1* worden stilgelegd, dat verantwoordelijk is voor het optreden van dubbelstrengsbreuken tijdens de recombinatie.<sup>4</sup> Verder kan ook het *dmc1* gen worden stilgelegd, dat ervoor zorgt dat tijdens de recombinatie stukken chromosoom worden uitgewisseld. Het transgen dat verantwoordelijk is voor het stilleggen van de recombinatie in de meiose, doet dit overigens voor alle chromosomen.

Teneinde tot het gewenste resultaat te komen, wordt in de plant één kopie van het RNAi transgen ingebouwd. Bij de meiose zal dan ook slechts de helft van de haploïde geslachtscellen het transgen bevatten, mede gezien het feit dat de meiotische recombinatie is stilgelegd. Vervolgens wordt het chromosoomaantal van de gevormde microsporen verdubbeld. Microsporen zijn de nog onrijpe stuifmeelkorrels van een plant; ze kunnen in een weefselweek embryo's vormen. Microsporen zijn in principe haploïd, maar na verdubbeling van het chromosomenaantal kunnen hieruit volledig disome, homozygote planten ontstaan. Deze techniek wordt ook wel die van de verdubbelde haploïden genoemd.

Vervolgens worden de transgene planten verwijderd. Er wordt alleen verder gegaan met planten die géén RNAi construct bevatten. Deze diploïde, homozygote planten worden gebruikt als ouders voor de reconstructie en zaaizaadproductie van het oorspronkelijke heterozygote genotype. Het eindproduct van de reverse breeding techniek is niet transgeen, aangezien het geen vreemd genetisch materiaal bevat of andere mutaties in het genoom.

### *Risico's van reverse breeding*

Eén van de belangrijkste kenmerken van de reverse breeding techniek is dat de zo verkregen nakomelingen niet transgeen zijn. Een risicoanalyse, zoals die dient te worden uitgevoerd voor transgene planten, is daarom volgens de COGEM bij dergelijke transgen-vrije planten, die met reverse breeding zijn geproduceerd, overbodig. De planten bezitten namelijk geen nieuwe eigenschappen; er is niets toegevoegd of gewijzigd aan het genoom van de plant. Er zijn door reverse breeding geen nieuwe open leesramen ontstaan, waardoor toxische of allergene producten zouden kunnen worden gevormd. De planten zijn identiek aan de originele ouderlijnen van de oorspronkelijke heterozygote lijn (het uitgangsmateriaal). De risico's voor mens en milieu of voor de voedselveiligheid van producten van reverse breeding acht de COGEM dan ook gelijk aan die van gewone veredelingsproducten.

### *Regelgeving bij reverse breeding*

Zoals eerder opgemerkt wordt door sommigen gesteld wordt dat volgens de Europese wet- en regelgeving<sup>2</sup> een product als een ggo dient te worden aangemerkt, wanneer in het ontwikkelingsproces gebruik is gemaakt van genetische modificatie. Dat zou betekenen dat nakomelingen van een ggo, zelfs wanneer bij deze nakomelingen het desbetreffende gen niet meer in het genoom aanwezig is, en geen mutaties of andere veranderingen geïnduceerd zijn, ook als genetisch gemodificeerd moeten worden beschouwd. Dit betekent dat dergelijke planten vergunningsplichtig zijn en aan een uitvoerige milieu- en voedselveiligheid risicoanalyse onderworpen moeten worden.

De COGEM ondersteunt deze zienswijze niet en heeft ook geen nadere onderbouwing voor deze interpretatie van de Europese regelgeving kunnen vinden. De COGEM wijst erop dat de producten van reverse breeding niet genetisch gemodificeerd zijn en identiek zijn aan de 'natuurlijke ouderlijnen' van het oorspronkelijke uitgangsmateriaal. Hiermee vallen ze naar de mening van de COGEM niet onder de ggo-regelgeving.

**De COGEM adviseert dat planten die verkregen zijn met de techniek van reverse breeding als niet-ggo behandeld moeten worden.**

De COGEM signaleert dat indien reverse breeding producten onder de ggo- regelgeving gebracht worden er een handhavingsprobleem ontstaat. Dergelijke producten zijn op generlei wijze herkenbaar of detecteerbaar. Rechtstreekse controle op import vanuit landen waar reverse breeding producten niet onder de lokale ggo-regelgeving vallen is dan ook niet mogelijk. Ook regelgeving op het gebied van traceerbaarheid en etikettering is niet controleerbaar.

### 3. Agroïnoculatie

#### *Kenmerken agroïnoculatie*

Het gebruik van *Agrobacterium tumefaciens* om genetisch materiaal te integreren in het plantengenoom is één van de belangrijkste methoden voor de productie van genetisch gemodificeerde planten. De bacterie veroorzaakt door de expressie van oncogenen gelegen op het T-DNA doorgaans gezwellen bij geïnfecteerde planten.<sup>5</sup> Wanneer deze tumorinducerende genen vervangen worden door genen die verantwoordelijk zijn voor een gewenste eigenschap, kunnen deze genen in de plant worden ingebouwd. Plantencellen met een stabiel in het genoom geïntegreerd T-DNA kunnen worden geregenereerd tot fertiele transgene planten met de gewenste eigenschappen. Infectie met *A. tumefaciens* en transformatie kunnen plaatsvinden in vrijwel alle delen van de plant, maar in de praktijk wordt gekozen voor delen en ontwikkelingsstadia van de plant die efficiënt regenereren.

Bij agroïnoculatie is het regenereren van transgene planten juist niet het doel. De bacterie wordt met behulp van een injectiespuit in een bepaald weefsel (zoals het blad) gespoten, waarbij de expressie van het T-DNA in het geïnfecteerde weefsel plaatsvindt.<sup>6</sup> Overdracht van T-DNA naar de kern van de plantencel hoeft hierbij niet te leiden tot integratie van het T-DNA in het genoom, of zal beperkt blijven tot overdracht en inbouw in het genoom van slechts enkele cellen van het geïnjecteerde weefsel. Opgemerkt moet worden dat het theoretisch mogelijk is dat de geïnjecteerde bacterie zich door de plant kan verplaatsen en mogelijk toch elders cellen kan transformeren. Gegevens die deze mogelijkheid uitsluiten of bevestigen ontbreken grotendeels.

In de onderzoekspraktijk en de veredelingswereld wordt agroïnoculatie hoofdzakelijk toegepast als een snel instrument om planten te testen op resistenties of toleranties. Met behulp van agroïnoculatie kunnen genen in de plant tot expressie gebracht worden, waarna de reactie van het plantenweefsel op de geproduceerde eiwitten gevolgd kan worden. Planten die de gewenste eigenschap lijken te vertonen zullen vervolgens in het verdere veredelingsproces gebruikt en getest worden.

#### *Risico's van nakomelingen van agroïnoculatie*

De COGEM heeft zich al eerder gebogen over de vraag of zaden van planten na agroïnoculatie een ggo-vrije status zouden kunnen krijgen. De COGEM kwam tot de conclusie dat nakomelingen van geagroïnoculeerde planten in principe als niet-transgeen beschouwd moeten worden en dat de ggo-regelgeving daarom als

niet van toepassing beschouwd kan worden. Echter op dit moment is niet volledig uit te sluiten dat na agroïnoculatie nakomelingen transgene sequenties bevatten. Het is weliswaar onwaarschijnlijk dat via intern transport van *A. tumefaciens* transgeen DNA in eicel en gameten wordt ingebouwd, maar het is theoretisch niet uitgesloten. In de literatuur zijn experimenten beschreven waarbij bloemhoofdjes in een *A. tumefaciens*-suspensie worden gedoopt ('Floral-dip') en waaruit blijkt dat inbouw van T-DNA in de kiembaancellen mogelijk is.<sup>7</sup> Daarnaast is het theoretisch niet uit te sluiten dat de buitenkant van het zaad besmet raakt met de toegediende *A. tumefaciens*. Literatuurgegevens over de (on)mogelijkheden van onbedoelde transformatie van nakomelingen en besmettingen van zaad met *A. tumefaciens* ten gevolge van agroïnoculatie ontbreken.

De COGEM laat daarom een onderzoeksproject uitvoeren om ontbrekende kennisaspecten boven tafel te krijgen. De resultaten van dit onderzoek worden eind 2006 / begin 2007 verwacht. De COGEM zal aan de hand van de resultaten uit het onderzoeksrapport concluderen wat de risico's zijn van nakomelingen van agroïnoculatie, en of een ggo-vrije status verdedigbaar is.

Wanneer uitgesloten kan worden dat *A. tumefaciens* in de nakomelingen terecht komt, zal de COGEM conform haar vorige advies adviseren om een ggo-vrije status aan de nakomelingen toe te kennen. De COGEM wil de overheid er nu alvast op wijzen dat voor deze techniek een aanpassing van de regelgeving wellicht nuttig kan zijn.

**De COGEM adviseert om een ggo-vrije status aan de nakomelingen toe te kennen van planten die een agro-inoculatie behandeling hebben ondergaan, mits uitgesloten kan worden dat *A. tumefaciens* in de nakomelingen terecht komt.**



## 4. Geninactivering door DNA-methylering

### *Kenmerken geninactivering door DNA-methylering*

In de afgelopen jaren is er veel aandacht ontstaan voor epigenetische effecten in de moleculaire genetica. Met epigenetische effecten worden overerfbare veranderingen in de functie van genen bedoeld die niet terug te voeren zijn op veranderingen in de DNA sequentie. Voor de veredelingswereld is epigenetica interessant omdat het de mogelijkheid biedt effecten in nakomelingen zoals veranderde genexpressie teweeg te brengen.

Aan epigenetische effecten liggen tal van mechanismen ten grondslag die binnen en tussen individuen en generaties kunnen optreden. De moleculaire mechanismen die de epigenetische code vormgeven zijn vooral DNA methylering, histonmodificering, zoals acetylering, RNA-interferentie en mechanismen gebaseerd op chromatine(-veranderingen).

RNA interference (RNAi) is een epigenetisch mechanisme van genregulatie. RNAi is een evolutionair geconserveerd mechanisme dat ervoor zorgt dat genen geïnactiveerd worden. RNAi maakt gebruik van dubbelstrengs-RNA en niet-coderende ‘small RNAs’ als sequentie specifieke regulatoren. Inactivatie van genen, ook wel aangeduid als *gene silencing*, kan op twee manieren plaatsvinden: post-transcriptioneel en transcriptioneel.

Post-transcriptionele *gene silencing* (PTGS) kan veroorzaakt worden door de inbreng van een transgen of dubbelstrengs RNA, maar ook door een virus. PTGS houdt in dat in het cytoplasma het gevormde mRNA geïnactiveerd wordt door homologe dubbelstrengs-RNA, dat zorgt voor de afbraak van het mRNA. Het RNA wordt na de transcriptie afgebroken; daardoor wordt er geen functioneel eiwit gevormd. Het RNAi-mechanisme is ook in de kern werkzaam en is daar betrokken bij RNA-afhankelijke DNA-methylering (RdDM). Hierdoor kan transcriptioneel *gene silencing* (TGS) optreden, hetgeen voor het eerst in planten is aangetroffen.<sup>8</sup> In het algemeen kan gesteld worden dat in eukaryoten DNA-methylering een belangrijke rol speelt in genexpressie, genomorganisatie en -stabiliteit, ‘*genomic imprinting*’ en ontwikkelingsaspecten.<sup>9</sup>

In planten zijn genen gevonden die niet tot expressie komen als gevolg van methylering van de promotor. Methylering wordt overal op chromosomen aangetroffen en wordt gezien als een van de belangrijkste regelmechanismen van de cel. In gebieden waar het DNA sterk gemethyleerd is, staan de genen over het algemeen uit en gebieden met weinig methylering hebben over het

algemeen actieve genen. Deze methyleringspatronen zijn meiotisch stabiel en daardoor overerfbaar. Bij zoogdieren worden de epigenetische patronen elke generatie geherprogrammeerd. Daardoor zijn deze patronen bij zoogdieren slechts in zeer beperkte mate overerfbaar.

RdDM vereist net zoals de cytoplasmatische RNAi, dubbelstrengs-RNA dat wordt verwerkt tot kleine RNA-moleculen (21-24 nucleotiden)<sup>10</sup>. Wanneer deze kleine dubbelstrengs RNA-moleculen sequenties bevatten die homoloog zijn aan promotorsequenties, kunnen ze methylering van de promotor bewerkstelligen. Dit zorgt voor transcriptionele *gene silencing*.<sup>10,11</sup> Sijen *et al.* (2001)<sup>12</sup> hebben dit proces voor het eerst laten zien bij een endogeen gen, waarvan de promotor 'gesilenced' wordt.

De gemethyleerde status kan bij planten diverse generaties blijven bestaan, zelfs wanneer het originele RdDM-inducerende transgen door kruising is verdwenen. Dit betekent dat de nakomelingen niet-transgene planten zijn, terwijl er toch een gen is uitgeschakeld. Gebleken is dat het epigenetische effect over meerdere generaties overerft, waarbij het mechanisme langzaam aan kracht verliest en uitdooft. Het mechanisme heeft de interesse van plantenveredelaars gewekt en zou als alternatief kunnen dienen voor de 'klassieke' RNAi. In de 'klassieke' RNAi moet het RNAi-transgen altijd aanwezig zijn. Op deze wijze wordt het mogelijk voor de veredelaar om een niet-transgene plant te produceren waarin geen wijzigingen of mutaties in het genoom zijn aangebracht maar wel de genexpressie is beïnvloedt. Hierbij is de toepassing van promotor-RdDM vergelijkbaar met die van reguliere RNAi. Dat wil zeggen dat er naar alle processen wordt gekeken waarbij het uitschakelen van een gen gunstig zou zijn voor productie of consumptie. Voorbeelden hiervan zijn het uitschakelen van vruchtrijpsingenen, van bepaalde bloemkleuren, van allergenen, en van oxidases die betrokken zijn bij het bruin worden van appels als gevolg van beschadiging.<sup>13</sup>

Op dit moment is het overigens nog niet mogelijk om epigenetische effecten gericht uit te zetten. Dat wil zeggen dat thans alleen het 'uitzetten' van genen tot de mogelijkheden behoort, maar dat het niet mogelijk is om op dit moment 'uitgeschakelde' genen weer 'aan te zetten'.

Epigenetische effecten zijn niet uitsluitend het gevolg van de bovenbeschreven techniek of van genetische modificatie. Ze kunnen ook optreden als gevolg van veranderende milieuomstandigheden, in de klassieke veredeling en bij spontane mutaties ten gevolge van het dynamische karakter van het genoom. Een van de oorzaken van de variatie in genexpressie in hybriden ten opzichte van de genexpressie in hun ouders kan epigenese zijn.<sup>14, 15</sup>

*Risicobeleid en DNA-methylering*

In dit advies c.q. signalering zal niet verder worden ingegaan op de risico's van DNA-methylering of andere epigenetische processen, omdat er nog onvoldoende over bekend is. Onduidelijk is onder meer hoe stabiel epigenetische veranderingen zijn en hoe het mechanisme van overerving verloopt. Epigenetica is een nieuw vakgebied en de eventuele toepassing van epigenetische fenomenen in plantenveredeling staat nog in de kinderschoenen. Deze signalering beoogt niet een uitputtend inzicht in de huidige stand van zaken rond epigenetica te geven. De COGEM heeft een onderzoeksproject laten uitvoeren naar epigenetica.<sup>16</sup> Het onderzoeksrapport biedt een overzicht van de huidige kennis zowel op het gebied van planten als dierlijke organismen en de eventuele toepassingen.

*Regelgeving rond epigenetica*

Onduidelijk is op dit moment in hoeverre de toepassing van epigenetische effecten onder de ggo-regelgeving valt. Indien een transgen aanwezig is in de plant om het effect te induceren is er geen twijfel dat de ggo-regelgeving van toepassing is. Ook in het geval dat één van de ouderlijnen genetisch gemodificeerd was en de dochter daarvan de sporen draagt, kan gesteld worden dat hier de ggo-regelgeving van toepassing is. Echter bij andere vormen van inductie van epigenetische effecten lijkt de ggo-regelgeving niet van toepassing, ondanks het feit dat het hier een (tijdelijk) overerfbaar effect kan betreffen.

De COGEM signaleert dat het op dit moment te vroeg is om uitspraken te doen over eventuele milieurisico's van epigenetische mutanten. Het is daarnaast de vraag in hoeverre dergelijke planten onder de ggo-regelgeving vallen.



## 5. Enten op genetisch gemodificeerde onderstammen

### *Kenmerken van enten op gg-onderstammen*

Enten is een techniek die al eeuwenlang in de plantenveredeling wordt gebruikt. Bij enten wordt het knopdragende deel (de ent) van een plant gezet op het worteldragende deel (de onderstam) van een andere plant. Vooral in de fruitteelt wordt van oudsher gebruik gemaakt van enten. Onderstammen worden gebruikt, die leiden tot een betere groei beheersing van laagstamvruchtbomen of die beter bestand zijn tegen ziekten.

De laatste jaren is het gebruik van onderstammen in de groenteteelt sterk in opmars. Een groot deel van de tomaten, komkommers, aubergines, etc. wordt nu op onderstammen geteeld. Onderstammen blijken tot een aanzienlijke verhoging van de productie te kunnen leiden. Onderstammen en bovenstammen worden over het algemeen apart verkocht door de veredelaar. Het enten is specialistisch werk dat door een kweekbedrijf wordt uitgevoerd. De teler koopt uiteindelijk de geënte plant.

Bij het enten kunnen er tegenwoordig ook genetische gemodificeerde onderstammen worden gebruikt, die bijvoorbeeld schimmel- of virusresistent zijn gemaakt. Een voorbeeld hiervan is resistentie tegen een virus dat ernstige schade toebrengt aan onder andere komkommer, het *Cucumber fruit mottle mosaic virus* (CFMMV). Op dit moment zijn nog geen resistentiegenen beschikbaar tegen dit bodempathogeen. Er zijn ook genetisch gemodificeerde onderstammen geproduceerd die door de inbouw van een viraal gen resistent zijn tegen CFMMV.<sup>17</sup> De bovenstam van de resistente ent en dus ook de vruchten zijn echter niet genetisch gemodificeerd.

In laboratoria wordt tegenwoordig ook geëxperimenteerd met een andere toepassing van enten. Bij deze techniek gaat het om *short interfering RNA* (siRNA) moleculen, die in de genetisch gemodificeerde onderstam worden geproduceerd. Ze worden naar de ent getransporteerd en bewerkstelligen daar het gewenste effect.

siRNA's zijn oligonucleotiden die in staat zijn om een specifiek mRNA molecuul te inactiveren. Enten is een veelgebruikte techniek om effecten van siRNA te bestuderen onder laboratoriumomstandigheden. Meestal wordt gebruik gemaakt van enten tussen delen van tabaksplanten. Nu lijkt een meer toepassingsgerichte inzet mogelijk. Via deze techniek kan bijvoorbeeld de eiwitproductie in de bovenstam en de vruchten gereguleerd worden, zonder dat de bovenstam genetisch gemodificeerd behoeft te worden. Een ander bijkomend voordeel is dat tal van combinaties van de gg-onderstam met verschillende bovenstammen mogelijk zijn.

*Risico's van enten op genetisch gemodificeerde onderstammen*

Bij de hierboven beschreven vormen van enten zijn de producten van de bovenstam niet genetisch gemodificeerd. Echter, om ze te produceren is het gebruik van genetisch gemodificeerde onderstammen vereist.

De COGEM wijst erop dat bij het enten met genetisch gemodificeerde onderstammen aan de eisen van de huidige regelgeving voldaan dient te worden. Door deze productiewijze zullen er namelijk genetisch gemodificeerde planten, de onderstammen, op het veld staan. Deze dienen volgens de gangbare methoden van milieurisicoanalyse te worden beoordeeld. De regelgeving zou eventueel versoepeld kunnen worden wanneer de betreffende onderstammen geen pollen, bloemen of vruchten produceren. Bij sommige onderstammen, bijvoorbeeld van houtige gewassen (appel, peer, etc.), kunnen echter uitlopers van de onderstam ontstaan. Dergelijke uitlopers zouden eventueel wel bloemen en transgene zaden kunnen produceren. Om dit te voorkomen dient de opslag regelmatig te worden verwijderd. Ook de kans op spontane vegetatieve vermeerdering als potentieel milieurisico moet in ogenschouw genomen worden aangezien die tot verwildering zou kunnen leiden.

Ten aanzien van de bovenstam en van de producten hiervan wijst de COGEM erop dat deze geen transgene sequenties bevatten. Echter, transgene eiwitten, hormonen of siRNA's kunnen vanuit de transgene onderstam getransporteerd worden naar de bovenstam en daar accumuleren en een effect bewerkstelligen. Hoewel het transgen niet aanwezig is, kan de toegevoegde eigenschap in de bovenstam tot uiting komen. Het mogelijk hieraan verbonden milieurisico is niet op voorhand in te schatten zonder inzicht te hebben welk specifiek eiwit het betreft. Wanneer een eigenschap in de onderstam gecreëerd wordt met behulp van een RNAi construct is het mogelijk dat siRNAs naar de bovenstam worden getransporteerd. Een gen in de onderstam of een homoloog van het gen in de ent kan hierdoor worden stilgelegd. Aangetekend moet worden dat bij RNAi de expressie van genen verhinderd wordt en de kans dat er een (toxisch) eiwit gemaakt zal worden daarmee zeer klein is.

Risico's voor verspreiding van een transgen door uitkruising zijn afwezig. Immers de pollen afkomstig van de bloemen van de bovenstam zijn niet genetisch gemodificeerd. Ditzelfde geldt voor de zaden.

**Op basis van deze overwegingen adviseert de COGEM dat een casusspecifieke benadering noodzakelijk is en dat niet gesteld kan worden dat er per definitie geen risico's voor mens en milieu verbonden zijn aan bovenstam(producten) geënt op genetisch gemodificeerde onderstammen.**

*Regelgeving bij enten op genetisch gemodificeerde onderstammen*

Zoals eerder gesteld zijn genetisch gemodificeerde onderstammen vergunningplichtig en moeten zij een volledige risico-analyse ondergaan. Bij de risico-analyse moet ook de mogelijkheid in ogenschouw genomen worden dat moleculen van de onderstam naar de bovenstam getransporteerd worden en daar accumuleren of een effect veroorzaken.

Op dit moment is het onduidelijk of bovenstammen en de producten van bovenstammen die op genetische gemodificeerde onderstammen zijn geënt als genetisch gemodificeerd beschouwd moeten worden. Dit is een complexe juridische vraag, waarbij ondermeer in overweging genomen moet worden of een ent in juridische zin als twee verschillende planten of als één plant beschouwd moet worden. Daarnaast speelt een rol dat het genetische materiaal van de bovenstam niet veranderd is maar dat de bovenstam mogelijk veranderde eigenschappen tentoonspreidt of dat een transgeen eiwit aanwezig is in de bovenstam en vruchten of zaden daarvan. In dergelijke gevallen is het denkbaar dat de Europese verordening 258/97 'nieuwe voedingsmiddelen' van toepassing is.<sup>18</sup> Daarnaast is het de vraag of de producten geëtiketteerd moeten worden als ggo.

Voor veredelaars en telers is het een groot voordeel als producten van deze geënte planten een ggo-vrije status zouden hebben. De juridische onduidelijkheid over de status van enten speelt al langere tijd en heeft geleid tot een impasse bij de verdere ontwikkeling van deze techniek.

De COGEM beveelt daarom aan dat de overheid op korte termijn uitsluitsel geeft over de gehanteerde interpretatie van de ggo-regelgeving in verband met producten van enten op genetisch gemodificeerde onderstammen. Het betreft hier commerciële toepassingen en marktintroducties. De COGEM realiseert zich dat dit een besluit is dat niet door de Nederlandse overheid maar binnen de Europese context genomen moet worden.

De COGEM signaleert dat het gewenst is dat een besluit genomen wordt of de producten van enten op genetisch gemodificeerde onderstammen volgens de huidige regelgeving als ggo beoordeeld worden of dat deze producten de ggo-vrije status zouden kunnen verkrijgen.





## 6. Oligonucleotiden

### *Kenmerken toepassing van oligonucleotiden*

De COGEM heeft vorig jaar een advies uitgebracht over toepassingen van oligonucleotiden.<sup>19</sup> Oligonucleotiden zijn korte RNA en/of DNA stukjes die toegediend kunnen worden aan mensen, dieren of planten om processen in de cel te reguleren. Oligonucleotiden kunnen afhankelijk van de samenstelling binden aan DNA, RNA of eiwitten, waardoor de expressie van genen gereguleerd of de sequentievolverde in het DNA veranderd kan worden. In het betreffende advies wordt een overzicht gegeven van de verschillende oligonucleotiden en hun toepassingen.

Oligonucleotiden worden nog weinig toegepast bij planten. Tot nu toe zijn in planten chimere RNA/DNA-oligonucleotiden gebruikt om specifieke puntmutaties aan te brengen (chimeraplastie). Hoewel deze oligonucleotiden in drie plantensoorten (maïs, tabak en rijst) gebruikt zijn, was steeds hetzelfde gen het doel van de mutaties, namelijk het gen dat codeert voor het enzym acetolactaat synthase (ALS) of, bij maïs, acetohydroxy acid synthase (AHAS).<sup>20,21,22,23</sup> Hoewel de verwachtingen over de toepassing van chimeraplastie aanvankelijk hooggespannen waren, lijken de chimere RNA/DNA-oligo's echter inefficiënt en zijn verkregen resultaten moeilijk reproduceerbaar. Naar verwachting zal deze techniek daarom weinig toepassing krijgen.

In het COGEM advies over oligonucleotiden wordt onder andere ingegaan op de zogenaamde derde generatie oligonucleotiden, die door een chemische modificatie zowel een hoge affiniteit voor het doelwit DNA hebben als een verminderde kans om te worden afgebroken door enzymen. Hierdoor zijn ze langer in de cel aanwezig en hebben ze een verhoogde effectiviteit. Ze worden overgedragen door middel van transfectie of electroporatie naar cellen of protoplasten. Voor toepassing in dierlijke en humane systemen zijn veelbelovende resultaten geboekt. Gedacht kan worden aan bijvoorbeeld de 'locked' nucleïnezuren (LNA).<sup>24,25</sup> Momenteel tracht men dit soort oligonucleotiden ook voor planten te ontwikkelen.

Een techniek die mogelijk wel op korte termijn in de plantenbiotechnologie zal worden toegepast, is de combinatie van oligonucleotiden en chemische mutagenticia om op een specifieke plaats in het DNA een mutatie aan te brengen. Een voorbeeld daarvan is een oligonucleotide met daaraan gekoppeld een radioisotoop, die bindt aan een specifiek stuk DNA en een dubbelstrengsbreuk teweegbrengt onder invloed van straling.<sup>26</sup>

De oligo zorgt hierbij voor de specificiteit maar sorteert zelf geen effect. Deze techniek is een vorm van mutagenese. Maar terwijl bij ‘klassieke’ mutagenese door de toepassing van straling of chemische mutagentia talloze willekeurige mutaties in het genoom worden veroorzaakt, kan bij gebruik van mutagentia gekoppeld aan oligo’s een meer specifiek verandering worden geïnduceerd. Overigens zijn onbedoelde mutaties door mismatch van het oligo of de aanwezigheid van een mutagens niet uit te sluiten.

#### *Risico’s van oligonucleotiden*

In het advies dat de COGEM vorig jaar heeft uitgebracht, worden de risico’s van oligonucleotiden beschreven. De COGEM maakt in dit verband onderscheid tussen oligonucleotiden die een interactie aangaan met RNA of eiwitten en die een interactie aangaan met DNA. De COGEM is van mening dat bij gebruik van oligonucleotiden, die een interactie aangaan met RNA of eiwitten, de kans verwaarloosbaar klein is dat sequentieveranderingen in het genoom geïnduceerd worden. Met betrekking tot oligonucleotiden die een interactie met het DNA aangaan, is de COGEM van mening dat deze kunnen leiden tot sequentieveranderingen. Daarbij bestaat een zeer kleine kans dat naast bedoelde ook onbedoelde sequentiemodificaties geïnduceerd worden.

#### *Regelgeving rond oligonucleotiden*

De overheid heeft tot nu toe geen besluit heeft genomen over het beleid ten aanzien van oligonucleotiden. Het adviesrapport van de COGEM uit 2005 over de toepassingen van oligonucleotiden beoogt hierbij ondersteuning te bieden. De COGEM vraagt in het bijzonder aandacht voor technieken waarin oligonucleotiden met daaraan gekoppeld chemische mutagentia worden gehanteerd. De COGEM voorziet dat in de toekomst in de plantenbiotechnologie mogelijk gebruik zal worden gemaakt van dergelijke oligonucleotiden met daaraan gekoppeld een EMS-molecuul of een ander mutagens, om gericht een (punt)mutatie in het DNA aan te brengen. Volgens de huidige gg-wetgeving zijn organismen die vervaardigd zijn met behulp van chemische mutagenese vrijgesteld van de regelgeving. De COGEM is van mening dat de koppeling van een oligo het karakter van het mutageen of het mutagene-proces niet verandert. Wel zullen door de verhoogde specificiteit de risico’s verbonden aan mutagenese verminderen.

**Naar de mening van de COGEM moeten oligo’s gekoppeld aan mutagenen beschouwd worden als chemische mutagentia. De COGEM adviseert dan ook om organismen die geproduceerd zijn met deze oligo-mutagentia gelijk te stellen aan organismen vervaardigd met behulp van ‘klassieke’ mutagentia.**

## 7. Gerichte mutagenese met homologe recombinitie

### *Kenmerken gerichte mutagenese met homologe recombinitie*

Bij de huidige transformatietechnieken worden de transgenen op een min of meer willekeurige locatie in het genoom ingebouwd. Er wordt daarom aan methoden gewerkt om genen gericht in het genoom van de plant in te brengen.

Integratie van transgenen in het plantengenoom vindt plaats via een proces van zogenaamde niet-homologe recombinitie. In het eukaryote modelsysteem *Sachcaromyces cerevisiae* is aangetoond, dat niet-homologe integratie tot stand komt door middel van de eiwitten die in de cel betrokken zijn bij het herstel van dubbelstrengs DNA breuken via ‘non-homologous end-joining’ (NHEJ).<sup>27</sup> Deze NHEJ-eiwitten zijn sterk geconserveerd van gist tot plant en dier.

De willekeurige integratie in het genoom van transgenen leidt tot een onvoorspelbare structuur van het transgene locus (zoals het aantal kopieën van het geïntegreerde gen, de co-integratie van ander zogenaamd ‘filler-’ DNA en aanzienlijke doch onvoorspelbare verschillen in de expressie van hetzelfde transgen in verschillende transformanten, de zogenaamde ‘positie-effecten’). Om deze effecten te voorkomen wordt geprobeerd methoden te ontwikkelen waarmee transgenen gericht in één enkele kopie op een van te voren bepaalde plaats in het genoom kunnen worden geïntegreerd. Hierbij richt men zich op twee verschillende methoden, namelijk door gebruik te maken van het planteigen systeem voor homologe recombinitie of door gebruik te maken van (aan de plant aangepaste) recombinitie systemen voor plaats specifieke recombinitie.

Het bekendste voorbeeld van een plaats-specifiek recombinitie-systeem is het *Cre-lox* systeem afkomstig van de bacteriofaag P1. Hierbij wordt gebruik gemaakt van het enzym *Cre* dat recombinitie katalyseert tussen twee recombinase-bindingsplaatsen, die ook ‘lox-sites’ worden genoemd.<sup>28</sup> In de plantenbiotechnologie wordt dit systeem onder andere ook gebruikt om antibioticumresistentiegenen te verwijderen en zo merkervrije planten te maken, maar ook voor de plaats specifieke integratie van transgenen.<sup>29,30</sup>

Het grote voordeel van het gebruik van plaats specifieke recombinitie voor het integreren van transgenen is dat hetzelfde (moleculair volledig gekarakteriseerde) platform herhaald gebruikt kan worden voor integratie van ‘single copy’ transgenen. De structuur en samenstelling van het transgene locus kan van te voren worden bepaald en ook de expressie van het transgen is (op epigenetische effecten na) voorspelbaar.

Ook het planteigen homologe recombinitie (HR) systeem kan gebruikt worden voor gerichte integratie van transgenen. Hiertoe worden transgenen

omzoomd door sequenties die homoloog (identiek) zijn aan de sequenties op de positie in het genoom waar men het transgen wil insereren. Dergelijke gerichte integratie werkt zeer goed in gist en in embryonale stamcellen van de muis, maar minder efficiënt in schimmels, en somatische cellen van dieren en planten.<sup>31,32</sup>

Toch kunnen transgenen met lage efficiënte (1 op  $10^4$  à  $10^5$  transformanten) in principe ook in planten gericht worden geïntegreerd via homologe recombinatie.<sup>29</sup> De hoeveelheid werk die verbonden is met het verkrijgen van dergelijke aantallen transformanten maakt de methode echter voor de meeste gewassen niet praktisch toepasbaar. Er wordt onderzoek gedaan om toch een praktisch werkzame methode voor gerichte integratie te verkrijgen, omdat een dergelijke methode ook gebruikt kan worden voor de gerichte mutagenese van planteigen genen. In het laatste geval wordt de plantencel getransformeerd met een gemuteerde versie van (een deel van) een planteigen gen met de bedoeling de in het genconstruct aangebrachte mutatie te laten inbouwen in het planteigen gen. Op deze wijze kan ook een plant-eigen gen via insertie gericht worden geïnactiveerd. In combinatie met een plaatsspecifiek recombinatie systeem zoals *Cre-lox* kan ervoor worden gezorgd dat het gen in de uiteindelijke plant door de aanwezigheid van slechts een kleine insertie (met stopcodons) wordt geïnactiveerd.

De HR- en NHEJ- systemen functioneren in eukaryote cellen als reparatiesysteem van dubbelstrengs DNA breuken. Via HR worden dergelijke breuken verwijderd en het chromosoom hersteld door gebruik te maken van (bij voorkeur) het zusterchromosoom of van het homologe chromosoom als matrijs. Bij NHEJ wordt de breuk hersteld door het aan elkaar plakken van de gebroken DNA-strengen. Hierbij ontstaan vaak deleties of inserties op de plaats waar de DNA-breuk optrad.<sup>33</sup> Dergelijke dubbelstrengs DNA breuken vormen ook de entree site voor de integratie van transgenen.

In somatische cellen van planten en dieren vindt reparatie van dubbelstrengsbreuken bij voorkeur plaats via NHEJ.<sup>32,33</sup> Dit heeft tot gevolg dat de homologe recombinatie tussen vreemd en chromosomaal DNA slechts in weinig cellen optreedt. Toch kunnen chromosomale veranderingen via HR worden bewerkstelligd in planten. Zo zijn Terada *et al* er recent in geslaagd rijst op deze wijze genetisch te veranderen.<sup>34</sup>

Er wordt op het ogenblik op verschillende fronten onderzoek gedaan met als doel de efficiëntie van gerichte integratie en gerichte mutagenese in planten met behulp van HR te verhogen. Er worden drie verschillende strategieën gevolgd: 1) toevoeging van componenten van homologe recombinatiesystemen uit andere organismen zoals gist; 2) het uitschakelen van concurrerende recombinatie-

systemen in planten zoals van NHEJ; 3) verhoogde initiatie van de recombinatie door specifiek op de gewenste plaats dubbelstrengsbreuken in het DNA aan te brengen.

*Risico's van gerichte integratie met homologe recombinatie*

Gerichte integratie via homologe recombinatie zal het in de toekomst wellicht mogelijk maken om veiliger genetisch gemodificeerde gewassen te produceren. Transgenen integreren in het plantengenoom immers op willekeurige posities, terwijl met deze methode transgenen naar een van te voren bepaalde plaats kunnen worden gestuurd en daarnaast gerichte mutaties in bestaande genen kunnen worden aangebracht.

Bij homologe recombinatie kan voorkomen worden dat er open leesramen ontstaan die mogelijke schadelijke eiwitten tot gevolg hebben. Toch wordt er bij gerichte integratie met homologe recombinatie nog altijd DNA ingebouwd en wordt het plantengenoom veranderd. De plant verwerft een nieuwe eigenschap. De risico's van de toepassing van deze methode dienen daarom volgens de COGEM casusspecifiek te worden onderzocht.

*Regelgeving bij gerichte integratie met homologe recombinatie*

Het leidt geen twijfel dat gerichte integratie van transgenen via 'homologe recombinatie' en de producten die met behulp hiervan worden ontwikkeld onder de ggo-regelgeving vallen en vergunningplichtig zijn. Hierbij moet opgemerkt worden dat de methode ook gebruikt kan worden om (vrijwel) geen nieuw DNA toe te voegen, maar planteigen genen te muteren. Dit zal vragen gaan oproepen waarom dergelijke producten onder de ggo-regelgeving een volledige risico-analyse moeten ondergaan, terwijl andere identieke producten die op een andere wijze (bijvoorbeeld via chemische mutatie) geproduceerd zijn, niet beoordeeld hoeven te worden. Hoewel de nieuwe technieken in de plantenbiotechnologie erg verschillend kunnen zijn, is het eindresultaat soms vrijwel hetzelfde.

Met homologe recombinatie kan bijvoorbeeld een (punt)mutatie worden aangebracht in een gewenst gen. Dit resultaat verschilt niet van een mutatie aangebracht door een oligonucleotide of een mutatie aangebracht door een chemisch mutagens. Het verschil bestaat erin dat met homologe recombinatie een vrijwel identiek stuk DNA wordt uitgewisseld. Maar, op één mutatie na, kan dit slechts een exacte kopie zijn van het oorspronkelijke DNA.

De COGEM signaleert dat met de steeds verdere verfijning van technieken, - waarbij tegemoet gekomen wordt aan eerdere technisch-wetenschappelijke bezwaren -, het principe dat als tijdens de productie ggo-technieken zijn toegepast er sprake is van een inherent risico, steeds meer onder druk zal komen te staan.



## 8. Conclusies

De COGEM heeft een aantal nieuwe technieken in de plantenbiotechnologie beschreven die zich op het grensvlak van genetische modificatie bevinden. Plantenveredelaars, biotechnologiebedrijven en onderzoekers hebben aangegeven dat zij bezig zijn om met deze technieken nieuwe plantenrassen te ontwikkelen. De COGEM wil dan ook benadrukken dat het in dit rapport niet gaat om theoretisch mogelijke technieken, maar om technieken waarvan men commerciële verwachtingen heeft. Veredelaars zouden bij een aantal van deze technieken de transgen-vrije nakomelingen (reverse breeding, agroinoculatie) of transgen-vrije producten (enten met genetisch gemodificeerde onderstammen) op de markt willen brengen. Echter de verdere doorontwikkeling van deze technieken tot commerciële toepassingen stopt, omdat onduidelijk is of de producten onder de ggo-regelgeving vallen.

De COGEM realiseert zich dat de Nederlandse overheid gebonden is aan de EU-regelgeving. De Nederlandse overheid kan niet eenzijdig besluiten over vrijstelling voor commerciële toepassingen van bepaalde technieken of producten. Dit kan alleen door een gemeenschappelijk besluit van de EU-lidstaten. Ook een eenzijdige interpretatie van Nederlandse kant of een organisme als ggo en als vergunningplichtig beschouwd moet worden is onwenselijk. Dit zou kunnen leiden tot een situatie waarbij andere lidstaten het product wel als ggo beschouwen en de producent bij import of productie als in overtreding aanmerken. Dit zou ook in strijd zijn met EU Richtlijn 2001/18 die opgesteld is met als doel het harmoniseren van de interne markt en het vermijden van dergelijke situaties. De COGEM pleit er daarom voor dat de Nederlandse overheid zo snel mogelijk in overleg treedt met de andere EU-lidstaten en de Europese Commissie om tot een gemeenschappelijk besluit en oordeel te komen. De COGEM beoogt dat de informatie in dit advies en signalering dergelijk overleg te bevorderen en te ondersteunen.

Deze nota biedt zowel een aantal adviezen als signalerende opmerkingen. Gezien de complexe aard van het onderwerp heeft de COGEM gemeend niet een apart advies en signalering uit te geven maar beide facetten in één rapport te belichten. Hieronder worden de belangrijkste opmerkingen kort vermeld.

### *Advies*

De COGEM acht de risico's voor mens en milieu of voor de voedselveiligheid van producten van reverse breeding waarbij in de nakomelingen of het product geen sporen van genetisch modificatie te vinden zijn, gelijk aan die van

conventionele veredelingsproducten. De COGEM adviseert dat planten die verkregen zijn met de techniek van reverse breeding als niet-ggo beschouwd worden of worden vrijgesteld van de ggo-regelgeving.

De COGEM heeft eerder geadviseerd over de status van nakomelingen van agroïnoculeerde planten. De COGEM is van mening dat deze in principe geen ggo's zijn. Echter op dit moment is niet volledig uit te sluiten dat na agroïnoculatie nakomelingen onbedoeld transgene sequenties bevatten. Op dit moment zijn onvoldoende gegevens beschikbaar om geheel uit te sluiten dat bij agroïnoculatie zaad besmet raakt of gameten getransformeerd. De COGEM laat daarom momenteel een onderzoeksproject uitvoeren om deze vragen te beantwoorden. De COGEM verwacht begin 2007 een uitspraak te kunnen doen over deze problematiek.

Het induceren van overerfbare effecten in de functie van genen zonder dat daarbij de sequentie van het genoom wordt veranderd, is een voor de verdelingswereld zeer interessante toepassing. Echter onduidelijk is nog hoe stabiel deze zogenaamde epigenetische veranderingen zijn en hoe het mechanisme van overerving verloopt. Directe toepassing van epigenetica zonder dat de plant en zijn nakomelingen genetisch gemodificeerd zijn, worden niet op korte termijn verwacht. De COGEM acht het nog te vroeg om uitspraken te doen over eventuele milieurisico's van epigenetische mutanten. Daarnaast is het onduidelijk of epigenetische mutanten onder het juridische kader van de ggo-regelgeving vallen.

De COGEM merkt op dat de problematiek rond enten op genetisch gemodificeerde onderstammen al enige jaren speelt. Onduidelijk is of de niet gemodificeerde bovenstam en zijn producten onder de ggo-regelgeving vallen. De COGEM wijst erop dat dit een juridisch-politieke vraag is, waarover de overheid een besluit moet nemen. Met betrekking tot de (milieu)risico's is de COGEM van mening dat niet gesteld kan worden dat er per definitie geen risico's voor mens en milieu verbonden zijn aan bovenstam(producten) geënt op gg-onderstammen. Transgene eiwitten of siRNA's kunnen van de gg-onderstam naar de bovenstam getransporteerd worden. Daarom beveelt de COGEM een casusspecifieke benadering aan. De beoordeling van de milieurisico's kan overigens zowel plaatsvinden in het kader van de toelating van de gg-onderstammen alleen als bij een beoordelingstoelating van de combinatie van onder- en bovenstam.

De COGEM heeft al eerder in algemene zin geadviseerd over de risico's van oligonucleotiden.<sup>19</sup> Ze vraagt hier in het bijzonder aandacht voor technieken



waarin oligonucleotiden met daaraan gekoppeld chemische mutagentia worden gehanteerd, om gericht (punt-)mutaties in het DNA aan te brengen. Deze zouden ook met behulp van 'klassieke' mutagenese kunnen worden aangebracht. Mutagenese is volgens de Europese wet en regelgeving<sup>2</sup> vrijgesteld van de ggo-regelgeving, hoewel er via mutagenese op veel andere plaatsen in het genoom mutaties worden aangebracht waarvan de locaties en het effect onbekend zijn. Met behulp van mutagentia gekoppeld aan oligonucleotiden kunnen veel gericht mutaties worden aangebracht.

De koppeling van een nucleotidensequentie aan een chemisch of radio-actief mutagens verandert niet het karakter van het mutageen of het mutagenese-proces. Aangezien het oligo alleen een positioneringeffect heeft maar geen interactie aangaat met het genoom of zelf veranderingen induceert, is de COGEM van mening dat het oligo-mutageen complex als een 'normale' chemische stof c.q. mutageen beschouwd kan worden. De COGEM is daarom van mening dat gerichte mutagenese met behulp van oligonucleotiden eender is aan 'klassieke' mutagenese en daarom vrijgesteld moet worden van ggo-wet- en regelgeving. Daarnaast moet opgemerkt worden dat de risico's voor mens en milieu bij gerichte mutagenese kleiner zijn dan bij de 'klassieke' willekeurige mutagenese.

Gerichte integratie van transgenen via homologe recombinatie en de planten die met behulp van deze techniek worden geproduceerd, vallen zonder enige twijfel onder de noemer van genetische modificatie. Deze techniek is in het overzicht opgenomen omdat het een aantal veiligheidsoverwegingen van de huidige modificatie-technieken ondervangt. Met behulp van homologe recombinatie en aanverwante technieken kunnen op gerichte wijze mutaties in de genen van de plant worden ingebracht. Hiermee worden onbedoelde positioneringseffecten zoals de verstoring van andere plantengenen of het ontstaan van nieuwe chimere leesramen voorkomen. De COGEM acht de risico's van de integratie van transgenen met behulp van homologe recombinatie weliswaar kleiner dan bij traditionele transgenese, maar toch zal er altijd een milieurisicoanalyse moeten plaatsvinden wanneer een transgen wordt ingebracht.

### *Signalering*

De COGEM signaleert dat de ontwikkeling van de eerder geschetste technieken, evenals van toekomstige technieken, meer duidelijkheid en wellicht ook nieuwe interpretaties van de huidige wet- en regelgeving over ggo's vergt. De strakke scheidingslijn tussen wat wel en niet een ggo is, wordt steeds moeilijker vast te stellen. Of bepaalde technieken wel of niet onder de ggo-regelgeving vallen en een 'product-' of 'proces-gebaseerde' interpretatie van de regelgeving moet worden gehanteerd is hoofdzakelijk een juridisch-politieke keus. Naast de

technisch-wetenschappelijke argumenten kunnen daarbij ook ethisch-maatschappelijke aspecten een rol spelen

De COGEM wil het economische belang benadrukken van het tijdig maken van beleidskeuzes in verband met nieuwe technieken in de plantenbiotechnologie. Bedrijven en plantenveredelaars bepalen hun strategie immers mede op basis van de voorwaarden die de overheid creëert. Wanneer de overheid besluit om de besproken technieken of producten van deze technieken zonder meer onder de GGO-richtlijn te laten vallen, acht de COGEM de kans reëel dat de plantenveredelaars en biotechnologiebedrijven besluiten om niet verder te gaan met de techniek of in ieder geval niet in Nederland verder te gaan met deze techniek. De hoge kosten die gepaard gaan met de opbouw van een dossier voor toelating van een genetisch gemodificeerd gewas kunnen de betrokken bedrijven doen besluiten om de ontwikkeling hiervan niet in Nederland of Europa te laten plaatsvinden. De COGEM signaleert dan ook dat de beslissing of bepaalde technieken wel of niet onder de regelgeving vallen, economische gevolgen heeft.

De COGEM merkt verder op dat de ontwikkeling van steeds verfijndere technieken die ingezet kunnen worden om op snelle en efficiënte wijze resultaten te bereiken, die ook via andere niet vergunningplichtige maar omslachtiger methoden bereikt kunnen worden, steeds vaker vragen zal oproepen over de noodzaak en redenen voor het uitvoeren van risico-analyses voor bepaalde ggo's.

De COGEM wijst erop dat nieuwe technische ontwikkelingen ook van invloed zullen zijn op de handhaafbaarheid van de Europese ggo-regelgeving. Sommige van de producten van de in dit rapport behandelde technieken zijn niet te onderscheiden van op conventionele wijze verkregen producten. Hiermee wordt controle op import, etikettering e.d. onmogelijk. De problematiek rond handhaafbaarheid speelt overigens niet alleen bij deze technieken. Ook bij import zal het steeds lastiger blijken om vermenging met niet aangemelde ggo's te ontdekken. Dit zal de vraag oproepen hoe de keuzevrijheid van de consument gegarandeerd kan worden en of de verplichte etikettering van ggo's hiervoor voldoende waarborgen biedt.

In haar recente signalering<sup>1</sup> over de ethische en maatschappelijke aspecten van cisgenese heeft de COGEM naast economische, ook andere aandachtspunten opgesomd in het geval dat de overheid ervoor kiest om mogelijkheden te creëren voor vereenvoudigde toelatingsprocedures. Deze aandachtspunten

kunnen ook van belang zijn bij de besluitvorming of nieuwe technieken en hun producten onder de ggo-regelgeving vallen.

De argumenten worden hier niet allemaal herhaald. Maar de COGEM wijst erop dat haar advies om sommige technieken niet onder de ggo-regelgeving te laten vallen op technisch-wetenschappelijke gronden gebaseerd is. Niet iedereen in de maatschappij zal deze opinie delen. Sommigen zullen op basis van deontologische argumenten elke vorm van recombinant DNA technieken afwijzen. Zij zijn van mening dat hun keuzevrijheid beperkt wordt als producten waarbij dergelijke technieken in het productieproces gebruikt zijn niet als ggo worden aangemerkt. Deze argumentatie leeft ondermeer sterk in de biologische landbouw. De 'proces-interpretatie' sluit ook aan bij de benadering van de biologische landbouw, die een procesgestuurde en gecontroleerde vorm van landbouw nastreeft.

Anderen zullen hiertegen inbrengen dat in de huidige veredelingspraktijk al tal van DNA technieken gebruikt worden en dat het onderscheid tussen deze en de nieuwe gg-technieken moeilijk te maken valt.

Onduidelijk is wat de positie en mening van de consument is. Bij besluitvorming of de producten van bepaalde technieken al dan niet onder de ggo-regelgeving vallen, kan een punt van overweging zijn wat de consument verwacht met betrekking tot etikettering en dergelijke. Is het onderscheid tussen een product met gemodificeerde genen en een product zonder gemodificeerde genen, dat is ontstaan met gg-technieken voor de consument van belang? Mogelijkerwijs zou een consumentenonderzoek hierover meer duidelijkheid kunnen geven.

De COGEM beklemtoont het Europese karakter van de wet- en regelgeving over ggo's en van de waarborgen van coëxistentie en keuzevrijheid. Bij eventuele besluiten om nieuwe technieken wel of niet onder de ggo-regelgeving te brengen, zal rekening gehouden moeten worden met deze Europese dimensie.



Overzichtstabel COGEM advies 'Nieuwe technieken in de plantenbiotechnologie'

Techniek	DNA-insertie genetisch gescheiden van doelgen(en)?	Erfelijke verandering?	Fenotypische verandering?	GMO?	Vrijgesteld van de regelgeving?	Detecteerbaar?	
<b>Reverse breeding</b>	Ja	Voor uitkruisen wel erfelijke verandering. Daarna niet	Nee	Ouderlijnen ggo. Nakomelingen niet-ggo	Ouderlijnen niet vrijgesteld.	Ouderlijnen detecteerbaar. Nakomelingen niet.	
<b>Agroïnoculatie</b>	Insertie verdwenen	Nee	Nee	Nee	-	Nee	
<b>Epigenetische technieken</b>	<b>RNAi, transcriptioneel; Gene silencing door methylering van promoter.</b>	Ja	Ja	Ja	Ja	Nee	Ja
	<b>RNAi, transcriptioneel; Gene silencing door methylering van promoter. De insertie is 'uitgekruist'.</b>	Insertie verdwenen	Ja, indien de methylering vererft.	Ja.	?	?	Ja
	<b>RNAi, post-transcriptioneel. Inbouw van DNA dat RNAi vormt. Gene silencing door afbraak van mRNA.</b>	Ja	Ja.	Ja	Ja	Nee	Ja
	<b>RNAi, post-transcriptioneel. Transiënte expressie van DNA. Gene silencing door afbraak van mRNA.</b>	N.v.t.	Nee, voor zover het DNA niet ingebouwd wordt.	Ja, daar waar het DNA transiënt tot expressie komt, maar elders niet.	Nee, zolang DNA niet wordt ingebouwd of tot erfelijke veranderingen leidt.	Ja	Nee
<b>Enten op genetisch gemodificeerde onderstam. Transgeen eiwit of siRNA van onderstam naar ent</b>	Ja	Ent: Nee	Ent: Ja	?	?	Ent: niet op DNA-niveau	
<b>Gerichte mutatie d.m.v. oligonucleotiden</b>	Nee	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	
<b>Gerichte mutagenese door homologe recombinatie</b>	Ja en nee	Ja	Ja	Ja	Nee	Ja	



## Referenties

- 1 COGEM (2006). Ethische en maatschappelijke aspecten van cisgenese. Signalering CGM/060706-03
- 2 Richtlijn 2001/18/EG van het Europees parlement en de raad inzake de doelbewuste introductie van genetisch gemodificeerde organismen in het milieu en tot intrekking van Richtlijn 90/220/EEG van de Raad.
- 3 Patent nr. PCT/EP02/09526
- 4 Grelon M, Vezon D, Gendrot G, Pelletier G, (2001). AtSPO11-1 is necessary for efficiënt meiotic recombination in plants. *EMBO J* **20**:589-600
- 5 Tzfira T, Citovsky V, (2000). Pathogen profile. From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. *Mol. Plant Path.* **1**: 201-212.
- 6 Van der Hoorn RAL, Laurent F, Roth R, De Wit PJGM, (2000). Agroinfiltration is a versatile tool that facilitates comparative analyses of Avr9/CF-9-induced and Avr4/Cf-4-induced necrosis. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**: 439-446.
- 7 Clough SJ, Bent A F, 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 735-743.
- 8 Matzke MA, Birchler JA, (2005). RNAi mediated pathways in the nucleus. *Nature Rev. Gen.* **6**:24-35
- 9 Bird A, (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Development* **16**: 6-21.
- 10 Mette M, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke J, Matzke M, (2000). Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.* **19**: 5194-5201
- 11 Jones L, Ratcliff F, Baulcombe DC, (2001). RNA-directed transcriptional gene silencing in plant can be inherited independently of the RNA trigger and requires MET1 for maintenance. *Curr. Biol* **11**:747-757.
- 12 Sijen T, Vijn I, Rebocho A, Van Blokland R, Roelofs D, Mol JNM, Kooter JM, (2001). Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Cur. Biol.***11**:436-440.
- 13 Murata M, Nishimura M, Murai N, Haruta M, Homma S, Itoh Y (2001). A transgenic apple callus showing reduced polyphenol oxidase activity and lower browning potential. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**: 383-388.
- 14 Grant-Downtown RT, Dickenson HG, (2005). Epigenetics and its implications for plant biology. 1. The epigenetic network in plants. *Ann. Bot.* **96**: 1143-1146.
- 15 Grant-Downtown RT, Dickenson HG, (2006). Epigenetics and its implications for plant biology. 2. The 'epigenetic epiphany': epigenetics, evolution and beyond. *Ann. Bot.* **97**: 11-27.
- 16 Nap JP, Geurts van Kessel A (2006). Epigenetics in context. CGM2006-05
- 17 Gal-On A, Wolf D, Antignus Y, Patlis L, Ryu KH, Min BE, Pearlsman M, Lachman O, Gaba V, Wang Y, Shibolet M, Zelcer A, (2005). Transgenic cucumbers harboring the 54-kDa putative gene of *Cucumber fruit mottle tobamovirus* are highly resistant to viral infection and protect non-transgenic scions from soil infection. *Transgenic Res* **14**: 81-93
- 18 Verordening (EG) Nr. 258/97 van het Europees Parlement en de Raad van 27 januari 1997 betreffende nieuwe voedingsmiddelen en nieuwe voedsel ingrediënten
- 19 COGEM (2005). Toepassingen van oligonucleotiden. Effecten en potentiële genomveranderingen. Advies CGM/050707-02 (2005).
- 20 Beetham PR, Kipp PB, Sawycky XL, Arntzen CJ, May GD (1999). A tool for functional plant genomics: Chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause *in vitro* gene specific mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 87774-8778.

- 21 Zhu T, Peterson DJ, Tagliani L, st Clair G, Baszczynski CL, Bowen B, (2000). Targeted manipulation of maize genes *in vivo* using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 8768-8773.
- 22 Zhu T, Mettenburg K, Peterson DJ, Tagliani L, Baszczynski CL, (2000). Engineering herbicide-resistant maize using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. Nature Biotech. **18**: 555-558.
- 23 Okuzaki A, Toriyama K, (2004). Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-directed gene targeting in rice. Plant Cell Rep **22**: 509-512.
- 24 Wahlestedt C, Salmi P, Good L, Kela J, Johnsson T, Hökfelt T, Broberger C, Porreca F, Lai J, Ren K, Ossipov M, Koshkin A, Jakobsen N, Skouv J, Oerum H, Jacobsen MH, Wengel J, (2000). Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**: 5633-5638.
- 25 Petersen M, Wengel J, (2003). LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. Trends Biotechnol **21**:74-81.
- 26 Mezhevaya K, Winters TA, Neumann RD, (1999). Gene targeted DNA double-strand break induction by <sup>125</sup>I-labeled triplex-forming oligonucleotides is highly mutagenic following repair in human cells. Nucleic Acids Res. **27**:4282-4290.
- 27 Van Attikum H, Bundock P, Hooykaas, PJ, (2001) Nonhomologous end-joining proteins are required for Agrobacterium T-DNA integration. EMBO J **20**,:6550-6558.
- 28 Hoess RH, Abremski K, (1985). Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system. J Mol. Biology **181**: 351-362.
- 29 Hanin M, Paszkowski J, (2003). Plant genome modification by homologous recombination. Curr Opin Plant Biol.**6**:157-62.
- 30 Vergunst AC, Hooykaas, PJJ, (1998). Cre/lox-mediated site specific integration of Agrobacterium T-DNA in Arabidopsis thaliana by transient expression of Cre. Plant Mol. Biol. **38**: 393-406.
- 31 Brit AB, May, GD, (2003). Re-engineering plant gene targeting. Trends in Plant Science **8**: 90-95.
- 32 Ray A, Langer M, (2002). Homologous recombination: ends as the means. Trends in Plant Science **20**: 435-440.
- 33 Gorbunova V, Levy AA, (1999). How plants make ends meet: DNA double-strand break repair. Trends in Plant Science **4**: 263-269.
- 34 Terada R, Urawa H, Inagaki Y, Tsugane K, Iida S, (2002). Efficient gene targeting by homologous recombination in rice. Nat. Biotechnol. **20**:1030-1034.