



COMMISSIE
COGEM

GENETISCHE
MODIFICATIE

BEZOEKADRES:
A. VAN LEEUWENHOEKLAAN 9
3721 MA BILTHOVEN

POSTADRES:
POSTBUS 578
3720 AN BILTHOVEN

TEL.: 030 274 2777
FAX: 030 274 4476
INFO@COGEM.NET
WWW.COGEM.NET

Aan de minister van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
Mevrouw dr. J.M. Cramer
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 01 november 2007
KENMERK CGM/071101-04
ONDERWERP Advies herindiening veldproef aardappel met verhoogde phytophthora resistentie

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag over de ontwerpbeschikking IM 07-007 en de vergunningaanvraag, getiteld 'Potato with improved resistance to *Phytophthora infestans*', van BASF Plant Science, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de milieurisico's van kleinschalige (klasse-I) veldproeven met genetisch gemodificeerde aardappelen (*Solanum tuberosum*) met een verhoogde resistentie tegen *Phytophthora infestans*, de veroorzaker van aardappelziekte. Het doel van de voorgenomen werkzaamheden is aardappels beter resistent te maken tegen *P. infestans*. Dit kan leiden tot een verminderd fungicidegebruik bij de aardappelteelt.

Aardappel kan in Nederland niet uitkruisen naar wilde verwanten. Aardappel kan wel uitkruisen naar andere cultuurrassen maar slechts in beperkte mate en enkel over korte afstanden. De knollen zijn vorstgevoelig en zullen de Nederlandse winter gewoonlijk niet overleven. In de noodzaak om eventuele aardappelopslag uit zaad of achtergebleven knollen te verwijderen wordt in het kader van de verplichte bestrijding van *P. infestans* voorzien. De COGEM is verder van mening dat aan alle criteria die gesteld worden aan een klasse-I experiment wordt voldaan.

De COGEM heeft derhalve tegen de in de aanvraag beschreven werkzaamheden, onder de voorgestelde voorwaarden, geen bezwaar en acht de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman

Voorzitter COGEM

c.c. Dr. D.C.M. Glandorf

Dr. I. van der Leij

Kleinschalige veldproef met genetisch gemodificeerde aardappelplanten met een verhoogde ziekteresistentie tegen de ziekteverwekker *Phytophthora infestans*

COGEM advies CGM/071101-04

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de milieurisico's van kleinschalige veldproeven met genetisch gemodificeerde aardappelen (*Solanum tuberosum*) met een verhoogde ziekteresistentie tegen de ziekteverwekker *Phytophthora infestans*. Daarnaast is BASF Plant Science voornemens aardappelplanten met een veranderde zetmeelsamenstelling in de knollen te bestuderen en heeft hiertoe een aanvraag (IM 07-006) ingediend.

De onderhavige vergunningaanvraag heeft betrekking op kleinschalige werkzaamheden (klasse één) met genetisch gemodificeerde aardappelplanten in de gemeente Borger-Odoorn en Lingewaard. Deze vergunningaanvraag betreft aardappelplanten, waarin twee genen uit wilde aardappel (*Solanum bulbocastanum*) zijn ingebracht. Deze genen zijn betrokken bij de resistentie tegen *P. infestans*, een pathogene oömyceet, die aardappelziekte veroorzaakt. Aardappelziekte is een zeer veel voorkomende ziekte, die forse schade kan toebrengen aan de aardappelteelt. Aardappeltelers spuiten grote hoeveelheden fungiciden om een *Phytophthora*-infectie te voorkomen. De jaarlijkse kosten door schade en controle van deze ziekte worden wereldwijd geschat op drie miljard dollar (1). De verwachting is dat met behulp van de genetisch gemodificeerde aardappelen het fungicidegebruik in de aardappelteelt verminderd kan worden.

Geschiedenis dossier

De COGEM heeft in 2005 positief geadviseerd over de voorliggende aanvraag (2). Vervolgens is er door het ministerie van VROM een vergunning afgegeven voor de desbetreffende experimenten. Deze vergunning is echter door de Raad van State vernietigd op grond van procedurele overwegingen. BASF heeft naar aanleiding hiervan opnieuw een aanvraag voor een vergunning van deze aardappelplanten ingediend.

Milieurisicoanalyse

Bij de risicobeoordeling van de introductie in het milieu van genetisch gemodificeerde organismen (ggo's), zoals die door de COGEM wordt uitgevoerd, wordt gekeken naar de effecten die het ggo kan hebben op mens en milieu (waarbij de mens als integraal onderdeel van het milieu wordt beschouwd).

Onder risico wordt verstaan de combinatie van de gevolgen van een gevaar en de kans

dat deze gevolgen zich kunnen voordoen. De mogelijke schadelijke effecten van (toepassing van) een ggo worden vergeleken met die van het ongemodificeerde organisme (de zogenaamde 'baseline') waaruit het ggo is afgeleid. Bij introductie in het milieu wordt door de COGEM de staande landbouw en de klassieke veredeling als 'baseline' voor genetische gemodificeerde gewassen gebruikt (3).

De uitgangspunten en de methodiek van de milieurisicobeoordeling is in de EU richtlijn 2001/18/EG en de bijbehorende bijlagen beschreven. Hierin is vastgelegd dat bij de milieurisicobeoordeling zowel gekeken wordt naar mogelijk directe als naar indirecte schadelijke effecten van het ggo. Om tot een risico-inschatting te komen worden de volgende stappen doorlopen: de identificatie van kenmerken die schadelijke effecten kunnen hebben; de evaluatie van mogelijke gevolgen van het mogelijk optreden van schadelijke effecten; de evaluatie van de kans op het optreden van mogelijke schadelijke effecten; een schatting van het risico dat aan elk bepaald kenmerk van het ggo is verbonden; de bepaling van risicomanagement maatregelen; en de bepaling van het algeheel risico van het ggo.

Bij de voorliggende aanvraag kijkt de COGEM naar de risico's voor mens en milieu die verbonden zijn aan de introductie in het milieu van genetisch gemodificeerde aardappelplanten met een verhoogde ziekteresistentie tegen *P. infestans*. Zowel directe als indirecte effecten worden beoordeeld. Hierbij is de kans op verspreiding door pollen of zaden, het eventueel uitkruisen van aardappel met wilde verwanten of andere verwanten, mogelijke veranderingen in persistentie en invasiviteit van de plant en verwildering van belang. Daarnaast wordt gekeken naar eventuele nadelige effecten indien verspreiding van de ingebrachte genen in het milieu zou optreden. Ook incidentele consumptie of vraat en mogelijke toxische of allergene effecten op mens en dier zijn onderwerp van de risicoanalyse. Effecten op niet-doelwitorganismen zouden kunnen leiden tot een verstoring van voedselketens of ecosystemen. Een eiwit kan mogelijk intact blijven in insecten, waarna het door insecten verspreid kan worden vanuit het proefveld. Mogelijke schadelijke effecten op de bodemmicroflora zouden als gevolg een verstoring in de nutriëntenkringloop in de bodem kunnen hebben.

Teneinde de bovenstaande aspecten te kunnen beoordelen wordt een aantal factoren in ogenschouw genomen: de eigenschappen van het gastheerorganisme waarin de transgenen zijn ingebracht, de kenmerken van de ingebrachte transgenen, de mogelijke effecten van deze genen, de kenmerken van het ggo en de mogelijke interactie met het milieu waarin het ggo geïntroduceerd wordt.

De COGEM heeft eerder richtlijnen opgesteld voor de beoordeling van veldproefaanvragen met genetisch gemodificeerde planten (4). In deze richtlijnen worden

criteria beschreven voor een klasse-indeling van veldproeven teneinde mogelijke milieurisico's te voorkomen. Indien weinig kennis beschikbaar is, worden alleen kleinschalige werkzaamheden toegelaten waarbij eventuele nadelige effecten verregaand ingeperkt moeten worden. Voor grootschalige veldproeven met minder inperkende voorschriften is meer kennis van het ggo vereist. Deze kennis kan eventueel verkregen worden uit eerdere kleinschalige veldproeven, of andere bronnen. Het veldexperiment in de onderhavige aanvraag betreft een klasse één veldexperiment. Dit houdt in dat de jaarlijkse maximale omvang van de proef vijf hectare bedraagt op vijf locaties, waarbij elke locatie niet groter mag zijn dan één hectare. Eventuele effecten moeten bij een klasse één experiment beperkt blijven tot het proefobject.

Eigenschappen van het gewas

De aardappelplant (*S. tuberosum*) behoort tot de familie van de *Solanaceae* waartoe ook de tomaat, aubergine, tabak en peper behoren en is als landbouwgewas afkomstig uit Zuid-Amerika (5). *S. tuberosum* is onderverdeeld in twee ondersoorten: *tuberosum* en *andigena*. De ondersoort *tuberosum* wordt in Europa geteeld. De aardappel komt in de Nederlandse flora niet voor, wel heeft zij wilde verwanten: de zwarte nachtschade, (*S. nigrum* subsp. *nigrum*), de beklierde nachtschade (*S. nigrum* subsp. *schultesii*), bitterzoet (*S. dulcamara*), glansbes nachtschade (*S. physalifolium*) en driebloemige nachtschade (*S. triflorum*) (6). Uitkruising met in Nederland voorkomende wilde verwanten van de aardappel is niet mogelijk (7). In Europa zijn geen levensvatbare hybriden gevonden in natuurlijke systemen (9). In Nederland vormt aardappel een belangrijk akkerbouwgewas, waarbij de geteelde variëteiten zijn onder te verdelen in consumptieaardappels en zetmeelaardappels. De laatste categorie wordt voornamelijk in noordoost Nederland geteeld.

Aardappel kent de volgende structuren voor verspreiding en overleving: pollen, zaden en knollen. In haar natuurlijke ecosysteem en in de meeste ecosystemen waarin de aardappel als cultuurgewas wordt toegepast, vindt vrijwel altijd knolvorming en in de meeste gevallen ook bloei plaats. In Nederland wordt de aardappel vegetatief vermeerderd. Aardappelknollen zijn koude-gevoelig en overleven de winter in Nederland gewoonlijk niet. Alleen tijdens zachte winters zijn de aardappelknollen in staat te overleven en het volgende jaar uit te lopen (7).

De pollenkorrels van aardappel zijn relatief zwaar en worden verspreid via wind en insecten. Zowel kruis- als zelfbevruchting komt voor bij aardappel al vindt er hoofdzakelijk zelfbestuiving plaats (80-100%) (8). Uitkruising naar andere gecultiveerde aardappelrassen is in beperkte mate mogelijk en neemt sterk af naarmate de afstand toeneemt; op 1 m 24% en op 10 m nog 0.02% uitkruising (8, 10). Uitkruising vormt

bovendien geen milieurisico mits eventuele aardappelopslag routinematig wordt verwijderd zoals vastgelegd in de "Verordening Hoofdproductschap Akkerbouw bestrijding *Phytophthora infestans* bij aardappelen 2003"(7).

Het loof van de aardappelen, inclusief de bloeiwijzen, met eventuele zaden wordt gewoonlijk voor de oogst afgedood en niet verder benut. Er is aangetoond dat op een perceel zaden kunnen achterblijven die levensvatbaar zijn (11). Op basis van de ervaringen in de gangbare praktijk wordt verwacht dat een klein deel van deze zaden in staat is om de winter te overleven en te kiemen. Zaden worden niet door vogels verspreid. De zaden die eventueel worden gevormd door cultuuraardappelen zijn niet van agronomische betekenis, omdat bij de vermeerdering pootaardappelen worden gebruikt in plaats van zaden. Ook worden de eventuele zaden niet benut voor andere toepassingen.

Eigenschappen van de ingebrachte genen

De aardappelplanten zijn genetisch gemodificeerd met behulp van *Agrobacterium tumefaciens*, waarbij gebruik is gemaakt van twee vectoren: VCPMA16 en VCPMA19. Beide vectoren zijn afgeleid van pPZP200 en op beide vectoren zijn de volgende genen gelegen:

- *Rpi-blb1* gen met eigen promotor- en terminator sequenties, afkomstig uit *S. bulbocastanum*, coderend voor resistentie tegen *P. infestans*;
- *Rpi-blb2* gen met eigen promotor- en terminator sequenties, afkomstig uit *S. bulbocastanum*, coderend voor resistentie tegen *P. infestans*;
- *Tnos*, de terminator van het nopalinesynthasegen uit *A. tumefaciens*;
- *Pnos*, constitutieve promotor, afkomstig van *A. tumefaciens*;
- *ahas* gen, coderend voor acetoxyzuur synthase, afkomstig van *Arabidopsis thaliana*.

Beide vectoren verschillen van elkaar doordat de regulatiesequentie van *Rpi-blb1* in vector VCPMA19 langer is dan in vector VCPMA16. Beide vectoren die gebruikt zijn voor de genetische modificatie bevatten tevens het antibioticumresistentiegen *aadA*. Dit gen wordt gebruikt als selectiemarker bij transformatie-experimenten. Expressie van het gen resulteert in resistentie tegen spectinomycine. Het *aadA* gen is geplaatst op de "backbone" sequentie van de vector en zal niet in het genoom van planten worden ingebouwd. Naast de bovengenoemde genen bevat VCPMA16 en VCPMA19 enkele regulatoire sequenties. Alleen planten waarvan aangetoond is dat ze geen vectorsequenties bevatten, zullen in de veldexperimenten gebruikt worden.

Beide *Rpi-blb*-genen coderen voor resistentiegenen behorend tot de "nucleotide binding site (NBS)-leucine rich repeat (LRR)" klasse. Dit zijn receptoreiwitten, die zich in het

cytoplasma van de cel bevinden en afkomstig zijn uit wilde aardappel, *S. bulbocastanum*. Ze herkennen specifieke elicitor eiwitten die door *P. infestans* in de plant worden gebracht. Een elicitor is een verbinding of een mix van verbindingen die het afweermechanisme van de plant induceert. De herkenning van de elicitor door de receptor leidt via een signaleringsnetwerk tot een verdedigingsreactie van de plant. De verdediging vindt lokaal plaats, door middel van plaatselijke celdood wanneer het pathogeen een cel is binnengedrongen. Daarnaast vindt er een verdedigingsreactie in de gehele plant plaats, door middel van het aanschakelen van de expressie van genen die betrokken zijn bij de verdediging van de plant.

De genetisch gemodificeerde aardappelplanten bevatten tevens een gemuteerd *ahas* gen dat codeert voor acetoxyzuur synthase. Het enzym katalyseert de eerste syntheses stap van de aminozuren valine, leucine en isoleucine. De werking van een aantal herbiciden is gebaseerd op verstoring van dit enzym waardoor de vorming van deze aminozuren verhinderd wordt en de plant zal afsterven. Mutaties in het *ahas* gen kunnen resulteren in een verhoogde tolerantie voor deze herbiciden omdat de affiniteit tussen enzym en herbicide hierdoor verlaagd wordt.

Het *ahas* gen uit onderhavige aanvraag heeft een S653N mutatie ondergaan waardoor tolerantie voor het herbicide Imazamox is verkregen (12). Deze verworven resistentie is gebruikt als selectiesysteem voor de aardappeltransformaties.

Overweging en Advies

Overweging van mogelijke risico's van het genetisch gemodificeerde gewas

Aardappel kan in Nederland niet uitkruisen met wilde verwanten, maar wel in beperkte mate en enkel over kleine afstanden met andere gecultiveerde aardappelrassen (7). Opslagplanten kunnen ontstaan uit levensvatbare knollen dan wel uit zaden die zijn achtergebleven op het perceel of in de directe omgeving. Aardappelopslag uit knollen onderscheidt zich van opslag uit zaad. Aan opslag uit zaad zitten cotylen, terwijl die niet zitten aan opslag uit knollen. Opslag uit zaad heeft in de normale landbouwkundige praktijk een lage concurrentiekracht t.o.v. andere gewassen (14). Aardappelzaad is bovendien niet van agronomische betekenis omdat aardappelen in Nederland vegetatief worden vermeerderd. Aardappelknollen zijn koudegevoelig en kunnen alleen tijdens zachte winters overleven en het volgende jaar uitlopen (7).

Echter, in het kader van de verplichte bestrijding van de aardappelziekte, zoals is vastgelegd in de "Verordening Hoofdproductschap Akkerbouw bestrijding *Phytophthora infestans* bij aardappelen 2003", wordt eventuele aardappelopslag routinematig

verwijderd. Controle op uitvoering van de opslagbestrijding wordt uitgevoerd door NAK AGRO. In de praktijk blijkt dat aardappelopslag doelmatig bestreden wordt.

Aardappel kan zich in Nederland niet handhaven. Verwildering, het proces waarbij zich vanuit cultuurpopulaties blijvende wilde populaties ontwikkelen, is in Nederland dan ook niet waargenomen bij aardappel.

De COGEM merkt op dat een verhoging van een ziekteresistentie een fitness verhogend effect kan hebben, maar dat dit niet van belang is zolang opslag wordt bestreden en zolang aardappelen koudegevoelig zijn. Daarnaast is *P. infestans* niet het enige pathogeen van aardappel.

Overweging van mogelijke risico's van de ingebrachte genen

De aardappelplanten zijn genetisch gemodificeerd met behulp van het plasmide VCPMA16 of het plasmide VCPMA19, die beide afgeleid zijn van de vector pPZP200. Beide vectoren bevatten *Rp1-blb* genen, die coderen voor resistentie tegen de ziekteverwekker *P. infestans*. De genetisch gemodificeerde aardappelplanten bevatten tevens een gemuteerd *ahas* gen, waardoor tolerantie voor het herbicide Imazamox is verkregen (12). De COGEM merkt hierbij op dat deze herbicidenresistentie niet van agronomische betekenis is omdat de toepassing van Imazamox in Nederland verboden is.

Daarnaast zijn het antibioticumresistentiegen *aadA* en nog enkele regulatoire sequenties aanwezig op de “vectorbackbone”. De aanvrager zal alvorens de genetisch gemodificeerde aardappelplanten in het veld worden gezet gegevens aanleveren waaruit blijkt dat het *aadA* gen en andere op de “vectorbackbone” gelegen sequenties niet aanwezig zijn in de genetisch gemodificeerde aardappelplanten. De COGEM is van mening dat aan alle criteria voor de beschrijving van de constructen zoals die vereist zijn voor een klasse één experiment, wordt voldaan.

Advies

Het onderhavige advies heeft betrekking op een vergunningaanvraag voor veldexperimenten met genetisch gemodificeerde aardappelen met een verhoogde ziekteresistentie tegen *P. infestans*. Er zijn geen redenen te veronderstellen dat een verhoging van de resistentie tegen *P. infestans* in aardappelen zal leiden tot verwildering. De knollen zijn vorstgevoelig en zullen de Nederlandse winter gewoonlijk niet overleven. Alleen tijdens zachte winters zijn de aardappelknollen in staat te overleven en het volgende jaar uit te lopen. De genetisch gemodificeerde aardappel kan in Nederland niet uitkruisen naar wilde verwanten. De aardappel kan in zeer beperkte mate en enkel over korte afstanden uitkruisen naar andere cultuurrassen, maar dit vormt geen milieurisico. De isolatiezone

van twintig meter zoals door de aanvrager wordt gehanteerd, is voldoende om uitkruising naar cultuurverwanten te voorkomen. Bovendien zal eventuele opslag uit zaad of achtergebleven knollen worden bestreden in het kader van de verplichte bestrijding van *Phytophthora infestans*. In de praktijk blijkt dat aardappelopslag daarmee effectief bestreden wordt. De vector is voor een klasse één experiment voldoende gekarakteriseerd.

Dit alles overwegende heeft de COGEM tegen de in de aanvraag beschreven werkzaamheden, onder de voorgestelde voorwaarden, geen bezwaar en acht zij de risico's van deze veldproef voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. COGEM. (2005). Kleinschalige veldproef met genetisch gemodificeerde aardappelplanten met een verhoogde ziekteresistentie tegen de ziekteverwekker *Phytophthora infestans* (CGM051206-01)
2. Tutin TB, Burges NA, Chater AO, Edmondson JR, *et al.* (1972). Flora Europaea: Diapensiaceae to Myoporaceae. Cambridge University Press, Cambridge
3. COGEM (2002). Staande landbouw en klassieke veredeling als referentiekader (CGM/021017-06)
4. COGEM (2005). Indeling veldwerkzaamheden met genetisch gemodificeerde planten (CGM/050929-03)
5. Van der Meijden, R. (2005). Heukels' flora van Nederland, 23^e druk, Wolters-Noordhof, Groningen
6. Plaisted RL (1980). Potato. In: Fehr WR & Hadley HH (Eds). Hybridization of crop plants. Am. Soc. Agr. Wisconsin. USA
7. De Vries, FT, van der Meijden R, Brandenburg, WA. (1992) Gorteria, Botanical Files. A study of the real chances for spontaneous gene flow from cultivated plants to the wild flora of the Netherlands. Supplement 1
8. OECD. (1997). Consensus Document on the Biology of *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* (Potato) No. 8
9. Lawson H.M. (1983). True potato seeds as arable weeds. Potato Research 26: 237-246
10. McPartlan, H. Dale, P. (1994). An assessment of gene transfer by pollen from field-grown transgenic potatoes to non-transgenic potatoes and related species. Transgenic research 3, 216-225
11. Love S. and Pavek J. (1994). Ecological Risk of growing transgenic potatoes in the United States and Canada: potential for vegetative escape or gene introgression into indigenous species. American Potato Journal 71: 647-658
12. Andersson, M, Trifonova, A, Andersson, AB, *et al.* (2003). A novel selection system for potato transformation using a mutated AHAS gene. Plant Cell Reports 22: 261-267
13. Verslag Karna in het kader van vergunning BGGO 93/14, d.d. 22 december 1994, kenmerk WMS9415/ph

14. Wiel, C van de, B Lotz (2004) Inventarisatie van de wetenschappelijke kennis over uitkruising in maïs, koolzaad, aardappel en suikerbiet voor het coëxistentieoverleg 2004. Plant Research International Nota 322, Wageningen