



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 5 november 2007
KENMERK CGM/071102-01
ONDERWERP Advies 'Agroïnoculatie en de status van nakomelingen'

Geachte mevrouw Cramer,

Hierbij bied ik u aan het advies *Agroïnoculatie en de status van nakomelingen*, evenals het onderzoeksrapport *Project Agroïnoculatie* dat ten grondslag ligt aan het advies.

Samenvatting:

Met de techniek agroïnoculatie kunnen bepaalde genen in een plant tot expressie worden gebracht teneinde de reactie van de plant te testen. Het genereren van transgene planten is echter niet het doel. De techniek is gebaseerd op het injecteren van genetisch gemodificeerde (gg) bacteriën (*Agrobacterium tumefaciens*) in de bladeren van de plant, waarna in enkele cellen overdracht van het gewenste DNA-fragment (T-DNA genoemd) van de bacterie naar het plantengenoom plaatsvindt. Theoretisch is het mogelijk dat de bacteriën zich door de plant verplaatsen en ook elders cellen transformeren. Indien T-DNA integratie zou optreden in de kiembaancellen, zijn de nakomelingen genetisch gemodificeerd. Daarnaast zouden de bacteriën op het zaad van de plant kunnen terechtkomen. Nakomelingen van de plant zouden daarmee onder de ggo-regelgeving vallen. Voor het toekennen van een ggo-vrije status aan nakomelingen is het daarom vereist dat inbouw van T-DNA in kiembaancellen niet heeft plaatsgevonden en dat daarnaast nakomelingen vrij zijn van de bacteriën. Vanwege het ontbreken van wetenschappelijke gegevens hierover, heeft de COGEM een onderzoeksproject laten uitvoeren naar de kans op integratie van T-DNA en de aanwezigheid van bacteriën na agroïnoculatie bij het modelsysteem *Arabidopsis thaliana*. Uit het onderzoek blijkt dat inbouw van T-DNA in arabidopsiszaad niet is waargenomen. Daarentegen is besmetting van zaad met *A. tumefaciens* wel waargenomen. De COGEM concludeert dat agroïnoculatie bij *Arabidopsis* niet leidt tot gg-planten en ziet daarom geen redenen om de ggo-regelgeving van toepassing te laten zijn op nakomelingen van agro-geïnoculeerde arabidopsisplanten, mits de zaden ontsmet worden door middel van een gevalideerde methode. Deze conclusie kan echter niet verbreed worden tot andere plantensoorten. Per soort zal onderzocht moeten worden of *A. tumefaciens* de kiembaan kan passeren en of nakomelingen van agro-geïnoculeerde planten T-DNA vrij zijn.

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

Agroïnoculatie en de status van nakomelingen

COGEM advies CGM/071102-01

Inleiding

De techniek agroïnoculatie wordt in de onderzoekspraktijk en de veredelingswereld hoofdzakelijk toegepast als een snel instrument om planten te testen op resistenties of toleranties. Met behulp van agroïnoculatie kunnen genen in enkele cellen van 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. Het regenereren van transgene planten is bij agroïnoculatie niet het doel.

De techniek van agroïnoculatie berust op het injecteren van planten (meestal bladeren) met genetisch gemodificeerde (gg-) bacteriën van de soort *Agrobacterium tumefaciens*, waarna overdracht van een DNA-fragment (ook wel transfer-DNA of kortweg T-DNA genoemd) naar enkele plantencellen plaatsvindt. Vervolgens vindt expressie van het T-DNA in het geïnfecteerde weefsel plaats. Overdracht hoeft niet te leiden tot integratie van het DNA in het genoom van de plant, de genen komen dan alleen transiënt tot expressie. Verder blijft de overdracht en inbouw in het genoom meestal beperkt tot de plaats van injectie. Theoretisch is het echter mogelijk dat de bacteriën zich verplaatsen vanaf de bladeren en elders (zoals in de bloeiwijzen) cellen transformereren. Als inbouw van T-DNA plaatsvindt in de kiembaancellen, worden de nakomelingen gezien als een ggo. Ook wanneer gg-bacteriën op zaad van de plant terechtkomen, is de ggo-regelgeving van toepassing. Immers de nakomelingen kunnen gg-bacteriën bevatten of zelfs in theorie genetisch gemodificeerd worden door middel van deze bacteriën.

In 2004 is de COGEM gevraagd te adviseren over de status van nakomelingen verkregen van planten die gebruikt zijn voor agroïnoculatie (1). De COGEM was van mening dat voor toekennen van een ggo-vrije status aan nakomelingen het vereist is dat inbouw van T-DNA in kiembaancellen niet heeft plaatsgevonden en dat daarnaast nakomelingen vrij zijn van *Agrobacterium*. Vanwege gebrekkige wetenschappelijke gegevens over deze problematiek, kon de aanwezigheid van transgene sequenties en de aanwezigheid van bacteriën niet volledig worden uitgesloten. Daarom heeft de COGEM destijds opgemerkt dat een dergelijke status alleen toegekend kan worden indien door middel van onderzoek aangetoond wordt dat bij agro-inoculatie inbouw van T-DNA niet optreedt en dat *Agrobacterium* afwezig is in nakomelingen.

Om meer inzicht te krijgen in deze problematiek, heeft de COGEM, in het kader van haar onderzoeksprogramma, een studie laten verrichten met als modelsysteem *Arabidopsis*

thaliana (Zandraket). Het onderzoek is uitgevoerd door het Instituut Biologie Leiden en Plant Research International te Wageningen, en beschreven in het rapport 'Project agroïnoculatie'. Middels dit advies en het toesturen van het rapport, wil de COGEM u informeren over de resultaten van het onderzoek en adviseren over de status van nakomelingen.

Onderzoeksproject

Het onderzoek heeft zich gericht op de vraag of aan zaden van planten na agroïnoculatie een ggo-vrije status verleend kan worden. Om deze vraag te beantwoorden zijn 72 planten van de soort *A. thaliana* aan de onderzijde van het blad geïnoculeerd met *A. tumefaciens*. Vervolgens zijn 88.000 zaden afkomstig van deze planten bestudeerd op aanwezigheid van de bacterie en integratie van T-DNA. Het aantonen van de bacterie in de plant is mogelijk doordat de bacteriën voorzien zijn van een fluorescentielabel (dsRed). Integratie wordt gedetecteerd doordat het in de bacterie aanwezige T-DNA is voorzien van een ander fluorescentielabel (GFP) dat alleen tot expressie komt in de zaden van de plant. Na agroïnoculatie zijn de labels via verschillende methoden gedetecteerd. Met behulp van lasertechnologie is getracht om integratie van het T-DNA in het genoom aan te tonen. Deze technologie is ook, samen met de zogenaamde BioPCR, ingezet om de aanwezigheid van levend *A. tumefaciens* op zaden te detecteren. Het onderzoek is in tweevoud uitgevoerd.

Bevindingen onderzoek

Om te controleren of integratie van T-DNA in kiembaancellen na agroïnoculatie daadwerkelijk heeft plaatsgevonden, zijn in totaal ruim 175.000 zaden onderzocht met behulp van de laser-screening. Uiteindelijk bleek één zaadje een fluorescentiesignaal te geven. Na kiemen van dit zaadje en een daaropvolgende sequentieanalyse middels Polymerase Chain Reaction (PCR), bleek dat integratie van T-DNA niet aangetoond kon worden. Hoogstwaarschijnlijk betrof het een vals positief signaal van de laser-screening.

Als controle zijn planten behandeld met een zogenaamde 'floral-dip' methode. Hierbij worden de bloemhoofdjes in een suspensie van *A. tumefaciens* gedoopt. Deze methode geldt als worst-case scenario waarbij inbouw van T-DNA bij *Arabidopsis* bewerkstelligd kan worden. Bij deze methode werden bij een equivalent aantal zaden (170.000) 100 T-DNA integraties gevonden. Aangezien na agroïnoculatie geen inbouw aangetoond kon worden, kan gesteld worden dat het proces van zaadtransformatie na agroïnoculatie op zijn minst 100 maal minder efficiënt is dan na floral-dip transformatie.

Tevens is getest of zaad na agroïnoculatie besmet was met *Agrobacterium*. Dit bleek het geval te zijn. De vraag of zaadbesmetting had plaatsgevonden als gevolg van de verspreiding van de bacterie vanaf de inoculatieplaats of tijdens de oogst, is niet met

zekerheid te beantwoorden. Het is namelijk niet uit te sluiten dat het zaad tijdens de oogst besmet is geraakt doordat agro-geïnoculeerde bladresten in het zaad terecht kwamen.

Om te trachten de zaden vrij te krijgen van de bacterie, zijn de zaden gedurende één maand opgeslagen bij zowel kamertemperatuur als bij lage temperatuur en vochtigheid. Deze methode bleek niet effectief te zijn om de bacteriën af te doden. Daarentegen bleek uit een beperkte test dat een behandeling met een effectief antibioticum wel werkzaam was om de zaden vrij te krijgen van *Agrobacterium*. Gezien de kleine schaal van deze test, bevelen de auteurs van het rapport aan om deze behandeling verder uit te testen en te ontwikkelen.

Verder suggereren zij het risico van verspreiding van bacteriën na agroïnoculatie te beperken door gebruik van zogenaamde auxotrofe *Agrobacterium* stammen. Deze kunnen namelijk niet op zaden overleven.

Advies

Zoals eerder gesteld, is de COGEM van mening dat voor toekenning van een ggo-vrije status aan nakomelingen het vereist is dat inbouw van T-DNA in kiembaancellen niet heeft plaatsgevonden en dat daarnaast nakomelingen vrij zijn van *Agrobacterium*.

Naar de mening van de COGEM heeft het onderzoek aangetoond dat integratie van T-DNA in arabidopsiszaden na agroïnoculatie niet plaatsvindt. De COGEM adviseert daarom nakomelingen van agro-geïnoculeerde arabidopsisplanten niet als ggo te beschouwen.

De COGEM wijst er op dat aan de hand van het onderzoek geen generieke conclusies getrokken kunnen worden over de status van nakomelingen van agro-geïnoculeerde planten. Of nakomelingen wel of niet T-DNA bevatten, hangt af van de mate waarin *A. tumefaciens* zich door het floëem van de plant kan verspreiden en de kiembaan kan passeren. De architectuur van de plant verschilt sterk tussen verschillende plantensoorten en op basis van de resultaten met één plantensoort kan daarom niet gesteld worden dat *A. tumefaciens* bij geen enkele plantensoort het embryo kan bereiken. Daarom zal per plantensoort onderzocht moeten worden of en in welke mate *A. tumefaciens* zich door de plant verspreidt en of de bacterie de kiembaan kan passeren.

Het onderhavige onderzoek is ook een handreiking aan onderzoekers en bedrijfsleven door een proefopzet te schetsen die mogelijk ook voor andere plantensoorten dan de zandraket toepasbaar is.

De COGEM is verder van mening dat uit het onderzoek blijkt dat zaadbesmetting met *A. tumefaciens* niet valt uit te sluiten. Eventuele besmetting van zaad kan een probleemvormen, aangezien in dat geval sprake is van associatie met ggo's. De COGEM wijst er

daarom op dat zaden van agro-geïnoculeerde planten door middel van een gevalideerde methode ontsmet moeten worden.

In dit kader merkt de COGEM op dat de in het onderzoek gebruikte methode om de aanwezigheid van *A. tumefaciens* besmettingen in zaad te detecteren, geen volledig uitsluitel geeft. De detectiemethode (Bio-PCR) berust op een verrijkingstap door middel van extractie van plantenmateriaal en opkweek van bacteriën op een groeimedium, gevolgd door PCR. Echter bacteriën kunnen zich in een fysiologische toestand bevinden waarbij ze niet kweekbaar zijn op een groeimedium. Deze bacteriën kunnen met Bio-PCR niet gedetecteerd worden, maar zouden wel in staat kunnen zijn om plantenweefsel te koloniseren.

Concluderend adviseert de COGEM nakomelingen van agro-geïnoculeerde arabidopsisplanten niet onder de ggo-regelgeving te laten vallen, mits de zaden ontsmet worden door middel van een gevalideerde methode.

Referenties

1. COGEM (2004). Agro-inoculatie; de status van nakomelingen (CGM/040628-04).