



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

TEL.: 030 274 2777

FAX: 030 274 4476

INFO@COGEM.NET

WWW.COGEM.NET

DATUM 22 januari 2008
KENMERK CGM/080122-01
ONDERWERP Advies ontwerpbeschikking DGM/SAS IM 07-005

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag over de ontwerpbeschikking DGM/SAS IM 07-005 en de vergunningaanvraag getiteld 'Vermeerdering van de aardappelkloon AV 43-6-G7', aangevraagd door AVEBE U.A., deelt de COGEM u het volgende mee.

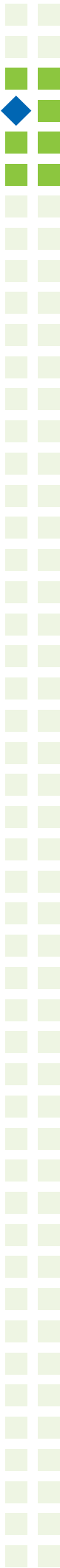
Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de milieurisico's van een grootschalige veldproef (categorie 3) met de genetisch gemodificeerde aardappelkloon AV 43-6-G7 (*Solanum tuberosum*). Deze aardappelkloon heeft als gevolg van de modificatie een verlaagd amylosegehalte. Het doel van de voorgenomen werkzaamheden is het vermeerderen van aardappel om voldoende aardappelen te krijgen voor het testen van de verwerking in een fabriek.

Aardappel kan niet kruisen met in Nederland voorkomende wilde verwanten, maar wel met andere gecultiveerde aardappelrassen. Echter, de kans dat dit gebeurt is klein omdat bevruchting bij aardappelplanten meestal plaatsvindt door zelfbestuiving. Aardappelknollen zijn vorstgevoelig, maar kunnen in Nederland zachte winters overleven. Uit eerdere experimenten is gebleken dat aardappelknollen met een verlaagd amylosegehalte normaal vorstgevoelig zijn. Wanneer aardappelknollen de winter overleven dan kunnen hieruit opslagplanten ontstaan. Uit aardappelknollen ontstane opslagplanten en opslagplanten die eventueel kunnen ontstaan uit zaden worden routinematig verwijderd in het kader van de verplichte bestrijding van *Phytophthora infestans*. In de praktijk blijkt dat aardappelopslag effectief bestreden wordt.

De COGEM is verder van mening dat aan alle aan een categorie 3 veldproef gestelde criteria wordt voldaan.

Gezien het bovenstaande heeft de COGEM 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,



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

Voorzitter COGEM

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

Dr. I. van der Leij

Grootschalige veldproef met de genetisch gemodificeerde aardappelkloon AV 43-6-G7 met een verlaagd amylosegehalte

COGEM advies CGM/080122-01

1. Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de milieurisico's van een categorie 3 veldproef met de genetisch gemodificeerde aardappelkloon AV 43-6-G7 (*Solanum tuberosum*) met een verlaagd amylosegehalte. De vergunningaanvrager, AVEBE U.A., wil de aardappelkloon AV 43-6-G7 vermeerderen om voldoende aardappelen te krijgen voor het testen van de verwerking op (proef) fabrieksschaal. In de huidige aanvraag is geen sprake van vervoeding of humane consumptie. De vergunningaanvraag (IM 07-005) betreft werkzaamheden met genetisch gemodificeerde aardappelplanten in de gemeente Aa en Hunze, Borger-Odoorn, Eemsmond, de Marne en Veendam.

Aardappelen bevatten van nature twee soorten zetmeel: amylose en amylopectine. De vergunningaanvraag betreft genetisch gemodificeerde aardappelplanten, waarin de expressie van het in de aardappelplant aanwezige *kgz* gen onderdrukt wordt. Het *kgz* gen codeert voor het enzym korrelgebonden zetmeelsynthase (KGZ) en is betrokken bij de synthese van amylose. Doordat de synthese van amylose onderdrukt wordt, heeft het zetmeel van deze planten een verlaagd amylosegehalte en een verhoogd amylopectinegehalte. Zuiver amylopectine wordt gebruikt bij specifieke technisch hoogwaardige toepassingen in onder andere de textiel- en papierindustrie. De aanvrager verwacht dat dankzij het amylosevrije zetmeel bij de verwerking voor hoogwaardige toepassingen minder energie en chemische hulpstoffen nodig zijn.

Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft in het verleden diverse keren positief geadviseerd over vergunningaanvragen waarin aardappelplanten met een verlaagd amylosegehalte waren verkregen door insertie van het *kgz* cDNA in een 'inverted repeat' (1-4). In de betreffende aanvragen is voor het verkrijgen van genetisch gemodificeerde aardappelplanten onder andere gebruik gemaakt van de vector pKGBA50mf-IR1.1. Deze vector is ook gebruikt voor het verkrijgen van aardappelkloon AV 43-6-G7.

2. 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 de introductie in het milieu wordt door de COGEM de staande landbouw en de klassieke veredeling als “baseline” voor genetische gemodificeerde gewassen gebruikt (5).

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 mogelijke 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 risicomanagementmaatregelen; en de bepaling van het algehele risico van het ggo.

Bij de huidige 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 verlaagd amylosegehalte. 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 de ingebrachte genen zich in het milieu zouden verspreiden. Ook incidentele consumptie, vraat en mogelijke toxische of allergene effecten op mens en dier zijn onderwerp van de risicoanalyse. Bovendien worden eventuele effecten op niet-doelwitorganismen bestudeerd. Effecten op niet-doelwitorganismen zouden kunnen leiden tot 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 een verstoring in de nutriëntenkringloop in de bodem als gevolg 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.

Wanneer de exacte locatie van een introductie niet bekend is wordt er bij het beoordelen van de risico's uitgegaan van een 'worst case scenario' (6). Dit betekent dat er vanuit wordt gegaan dat alle relevante geografische, klimatologische en ecologische omstandigheden die zich in Nederland kunnen voordoen ook daadwerkelijk in de directe omgeving van de introductie zullen voorkomen.

De COGEM heeft eerder richtlijnen opgesteld voor de beoordeling van veldproefaanvragen met genetisch gemodificeerde planten (7). In deze richtlijnen worden criteria beschreven voor een klassenindeling van veldproeven teneinde mogelijke milieurisico's te voorkomen. Wanneer 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.

De huidige aanvraag betreft een categorie 3 veldproef. Bij een categorie 3 veldproef moeten de daadwerkelijk in de transformant ingebrachte elementen bekend zijn. Daarnaast moet op basis van gegevens aannemelijk gemaakt worden dat eventuele schadelijke effecten voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn. Inperkende maatregelen zijn om die reden niet noodzakelijk. Bij een categorie 3 veldproef wordt er in principe geen maximum gesteld aan het aantal locaties en de omvang van de werkzaamheden. De aanvrager heeft aangegeven dat de werkzaamheden jaarlijks op maximaal zes locaties worden uitgevoerd met een maximale oppervlakte van 20 hectare per locatie. De gezamenlijke oppervlakte van de locaties zal maximaal 62 hectare per jaar bedragen.

2.1 Eigenschappen van het gewas

De aardappelplant (*S. tuberosum*) behoort tot de familie van de *Solanaceae* waartoe ook tomaat, aubergine, paprika, spaanse peper en tabak behoren (8). *Solanum tuberosum* wordt onderverdeeld in twee ondersoorten: subsp. *tuberosum* en subsp. *andigena* (8). Alleen de ondersoort *tuberosum* wordt in Europa geteeld (8).

In Nederland komen verschillende wilde verwanten van aardappel voor zoals zwarte nachtschade, (*Solanum nigrum* subsp. *nigrum*), beklierde nachtschade (*Solanum nigrum* subsp. *schultesii*), bitterzoet (*Solanum dulcamara*), glansbes nachtschade (*Solanum physalifolium*) en driebloemige nachtschade (*Solanum triflorum*) (9). Aardappel kan niet kruisen met in Nederland voorkomende wilde verwanten. Binnen het geslacht *Solanum*

bestaan verschillende kruisingsbarrières. Kruisingen van aardappel met verschillende in Nederland voorkomende verwanten leverden geen levensvatbare nakomelingen op (8). Bovendien zijn in Europa in natuurlijke systemen geen levensvatbare hybriden gevonden (10).

Uitkruising naar andere gecultiveerde aardappelrassen is in beperkte mate mogelijk. Bij aardappel komt zowel kruis- als zelfbevruchting voor, al vindt er hoofdzakelijk zelfbestuiving plaats (80-100%) (11). De pollenkorrels van aardappel worden verspreid via insecten en de wind, maar zijn relatief zwaar. Het percentage uitkruising neemt sterk af naarmate de afstand toeneemt. Op één meter bedraagt het uitkruisingspercentage 24%, maar op tien meter is dit nog maar 0,02% (12). Eventueel door kruisbestuiving ontstane levensvatbare zaden kunnen achterblijven op een perceel waarop aardappelen zijn geteeld (13). Op basis van ervaringen in de gangbare praktijk wordt verwacht dat een deel van deze zaden in staat is om de winter te overleven en te kiemen. Uitkruising vormt echter geen milieurisico als eventuele aardappelopslag routinematig wordt verwijderd zoals vastgelegd in de "Verordening Hoofdproductschap Akkerbouw bestrijding *Phytophthora infestans* bij aardappelen 2003" (14). Aardappelzaden worden niet door vogels verspreid, maar kunnen wel door kleine zoogdieren verspreid worden (8). Echter, deze zaailingen kunnen buiten het veld niet overleven omdat ze de competitie met andere planten niet doorstaan (8).

Aardappelplanten vormen knollen. Op het veld achtergebleven knollen zijn gevoelig voor vorst, maar kunnen zachte winters overleven. In Nederland worden opslagplanten ontstaan uit knollen die de winter hebben overleefd routinematig verwijderd in het kader van de verplichte bestrijding van *P. infestans*.

2.2 Eigenschappen van de ingebrachte genen

De aardappelplanten zijn genetisch gemodificeerd met behulp van *Agrobacterium tumefaciens*, waarbij gebruik is gemaakt van de vector pKGBA50mf-IR1.1. Deze vector is afgeleid van pBIN19. De aanvrager heeft met behulp van PCR en Southern blot aangetoond dat de volgende elementen in één kopie in aardappelkloon AV 43-6-G7 aanwezig zijn:

- gedeeltelijke rechter border afkomstig van *A. tumefaciens*;
- knol-specifieke promotor afkomstig van het *kgz* gen van aardappel;
- cDNA van het *kgz* gen van aardappel, in een 'inverted repeat' configuratie.

De 'inverted repeat' bestaat uit 1,1 kb van het 5' gedeelte van het *kgz* cDNA in een sense oriëntatie en uit het volledige *kgz* cDNA in een antisense oriëntatie.

De volledige sequentie van het insert inclusief 400 basenparen, die de rechter border flankeren, en 1494 basenparen, die de linker border flankeren, is bepaald.

In de 'inverted repeat' zijn delen van het *kgz* cDNA aanwezig in zowel een 'sense' als in een 'antisense' oriëntatie. Het RNA afkomstig van de 'inverted repeat' zal zich vormen tot een 'hairpin', die vervolgens gefragmenteerd wordt tot kleine RNA fragmenten. Deze RNA fragmenten zullen niet vertaald kunnen worden in een eiwit. Daarnaast leidt de aanwezigheid van de 'inverted repeat' tot RNA interferentie waardoor het endogene *kgz* mRNA wordt afgebroken en er geen KGZ eiwit ontstaat.

Het T-DNA gedeelte zoals dit in de pKGBA50mf-IR1.1 vector aanwezig is bevat een NOS terminator, afkomstig van het nopaline synthase-gen van *A. tumefaciens*. Deze terminator is tijdens de transformatie verloren gegaan en ontbreekt in aardappelkloon AV 43-6-G7. Hierdoor zal transcriptie na de 'inverted repeat' wellicht doorgaan in het flankerende planten DNA. Het RNA afkomstig van het 'inverted repeat' deel vormt een 'hairpin', die gefragmenteerd zal worden tot kleine RNA fragmenten die via het RNA interferentie proces het endogene KGZ mRNA zullen afbreken. Het enkelstrengs RNA dat resteert zal hoogstwaarschijnlijk worden afgebroken omdat het aan de 5' kant onbeschermd is tegen afbraak. Ook wanneer het op het flankerende planten DNA gevormde RNA niet direct wordt afgebroken is het onwaarschijnlijk dat dit vertaald wordt in eiwit omdat het geen 5'CAP bezit die nodig is voor translatie-initiatie.

De 'backbone' van de vector die gebruikt is voor de genetische modificatie bevat het antibioticumresistentiegen *nptIII*. Dit gen wordt gebruikt als selectiemarker bij transformatie-experimenten. De aanvrager heeft met behulp van PCR en Southern blot analyses aangetoond dat de vector 'backbone' niet in aardappelkloon AV 43-6-G7 aanwezig is.

3. Overwegingen en advies

3.1 Overweging van mogelijke risico's van het genetisch gemodificeerde gewas

Aardappel kan in Nederland niet uitkruisen met wilde verwanten, maar over kleine afstanden wel met andere gecultiveerde aardappelrassen (8). De kans dat dit gebeurt is echter klein omdat bevruchting bij aardappel meestal plaatsvindt door zelfbestuiving (8). Eventuele door kruisbestuiving ontstane zaden kunnen uitgroeien tot zaailingen. Echter, deze zaailingen kunnen buiten het veld niet overleven omdat ze de competitie met andere planten niet doorstaan (8).

Aardappelknollen zijn gevoelig voor vorst, maar kunnen een zachte winter overleven (8). Eerdere experimenten hebben uitgewezen dat een verlaagd amylosegehalte niet van invloed is op de vorstgevoeligheid van aardappelknollen (15). De COGEM heeft in 1995 naar aanleiding van deze resultaten een advies afgegeven waarin gesteld wordt dat de conclusie zich uitstrekt tot alle genetisch gemodificeerde aardappelen met een verlaagd

amylosegehalte, ongeacht het uitgangsras waar de genetisch gemodificeerde aardappelen van afgeleid zijn (16).

Opslagplanten kunnen ontstaan uit levensvatbare knollen of uit zaden die zijn achtergebleven op het perceel of in de directe omgeving. Opslagplanten kunnen worden aangetroffen na een zachte winter, maar eventuele aardappelopslag wordt 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 beklivende wilde populaties ontwikkelen, is in Nederland dan ook niet waargenomen bij aardappel.

In het monitoringsplan is opgenomen dat de genetisch gemodificeerde aardappelklonen regelmatig geobserveerd zullen worden zodat veranderingen in landbouwkundige kenmerken en overlevingskenmerken opgemerkt worden. De aanvrager geeft aan dat de proefvelden tijdens de gehele proefperiode regelmatig bezocht en geobserveerd zullen worden. De frequentie van observaties is afhankelijk van het groeiseizoen en varieert van enkele keren per week tot geen enkele waarneming (bij dood materiaal). Vastlegging van eventuele opgemerkte effecten wordt gegarandeerd door de wettelijke verplichting om waarnemingen in een logboek bij te houden en om jaarlijks een verslag van verrichtte werkzaamheden te overleggen. De COGEM constateert echter dat de koppeling tussen deze wettelijke verplichtingen en monitoring niet duidelijk in de aanvraag aanwezig is.

3.2 Overweging van mogelijke risico's van de ingebrachte genen

De aardappelplanten bevatten een 'inverted repeat' bestaande uit cDNA van het *kgz* gen in een 'sense' en 'antisense' oriëntatie. De COGEM heeft al diverse malen advies uitgebracht over genetisch gemodificeerde aardappelplanten met zo'n 'inverted repeat' (1-4, 17, 18).

Op de 'backbone' van de vector die gebruikt is voor de genetische modificatie zijn het antibioticumresistentiegen *nptIII* en enkele regulatoire sequenties aanwezig. De aanvrager heeft met behulp van PCR en Southern Blot analyses aangetoond dat de vector 'backbone' niet aanwezig is in aardappelkloon AV 43-6-G7.

3.3 Advies

Het huidige advies heeft betrekking op een vergunningaanvraag voor veldexperimenten met een genetisch gemodificeerde aardappelkloon met een verlaagd amylosegehalte. Er zijn geen redenen om aan te nemen dat verlaging van het amylosegehalte zal leiden tot een verhoogde kans op verwildering. Aardappelknollen zijn vorstgevoelig, maar kunnen een zachte winter overleven. Uit eerdere experimenten is gebleken dat een verlaagd

amylosegehalte geen effect heeft op de vorstgevoeligheid van aardappelen. Aardappel kan niet kruisen met in Nederland aanwezige wilde verwanten. Alhoewel aardappel over kleine afstanden kan kruisen met andere gecultiveerde aardappelrassen is de kans hierop klein. Eventueel ontstane zaailingen zijn niet in staat om buiten het veld te overleven. Opslagplanten kunnen ontstaan uit levensvatbare knollen of uit zaden die zijn achtergebleven op het perceel of in de directe omgeving. Eventuele opslag wordt bestreden in het kader van de verplichte bestrijding van *P. infestans*. In de praktijk blijkt dat aardappelopslag daarmee effectief bestreden wordt.

De COGEM is verder van mening dat aan alle criteria, die aan een categorie 3 veldproef gesteld worden, wordt voldaan.

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 (2001). Beproeving en vermeerdering van genetisch gemodificeerde aardappelplanten met een verlaagd amylosegehalte (CGM/011029-01)
2. COGEM (2003). Veldproef met genetisch gemodificeerde aardappelplanten met een verlaagd amylosegehalte (CGM/030909-01)
3. COGEM (2004). Testen en vermeerderen van genetisch gemodificeerde aardappelplanten met een verlaagd amylosegehalte (CGM/041221-01)
4. COGEM (2007). Veldproef met genetisch gemodificeerde aardappelplanten met een verlaagd amylosegehalte (CGM/070920-01)
5. COGEM (2002). Staande landbouw en klassieke veredeling als referentiekader (CGM/021017-06)
6. COGEM (2007). Benodigde locatie milieurisicobeoordeling (CGM/080122-02)
7. COGEM (2005). Indeling veldwerkzaamheden met genetisch gemodificeerde planten (CGM/050929-03)
8. OECD. (1997). Consensus Document on the Biology of *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* (Potato) No. 8
9. Van der Meijden R. (2005). Heukels' flora van Nederland, 23^e druk, Wolters-Noordhoff, Groningen
10. 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
11. Plaisted RL (1980). Potato. In: Fehr WR & Hadley HH (Eds). Hybridization of crop plants. Am. Soc. Agr. Wisconsin. USA

12. 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
13. Lawson HM. (1983). True potato seeds as arable weeds. *Potato Research* 26: 237-246
14. Hoofdproductschap Akkerbouw (2006) Verordening HPA bestrijding *Phytophthora infestans* bij aardappelen 2003.
15. Karna. (1994). Verslag in het kader van vergunning BGGO 93/14, d.d. 22 december 1994, kenmerk WMS9415/ph
16. COGEM (1995). Vorstgevoeligheid amylose-vrije aardappelen (CGM/950203-07)
17. COGEM (2005). Kleinschalige veldproef met genetisch gemodificeerde aardappelplanten met een verlaagd amylosegehalte (CGM/051206-03)
18. COGEM (2007). Kleinschalige veldproef met genetisch gemodificeerde aardappelplanten met een verlaagd amylosegehalte (CGM/071101-05)