

Aan de minister van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
Mevrouw J.C. Huizinga-Heringa
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 30 september 2010
KENMERK CGM/100930-01
ONDERWERP Advies: Ontwikkelingsstadia en levensvatbaarheid hybride planten

Geachte mevrouw Huizinga-Heringa,

Naar aanleiding van een adviesvraag van het ministerie van VROM over de levensvatbaarheid van hybrides tussen twee plantensoorten, adviseert de COGEM als volgt.

Samenvatting

Planten die zijn vervaardigd met behulp van celfusie of protoplastfusie worden aangemerkt als genetisch gemodificeerd organisme (ggo). Deze planten kunnen uitgezonderd worden van de ggo-regelgeving, als de ouders kunnen kruisen met behulp van conventionele veredelingmethoden. Hiervoor worden de nakomelingen van een kruising tussen twee ouderplanten op fenotype of genotype geanalyseerd. Dit kan op verschillende ontwikkelingsstadia worden uitgevoerd. De analyses vormen het bewijs dat de twee ouderplanten waarmee celfusie is uitgevoerd, met elkaar kunnen kruisen. VROM heeft vanuit deze context de COGEM verzocht de vraag te beantwoorden wanneer een hybride embryo of kiemplant de mogelijkheden heeft om uit te groeien tot een volwassen plant.

Niet alle kruisingen tussen verwante plantensoorten zijn mogelijk. Dit is het gevolg van kruisingsbarrières die bevruchting of de ontwikkeling van het embryo tegenhouden. Celdeling en differentiatie zijn nodig voor de juiste ontwikkeling van een plantenembryo. De COGEM is van mening dat het stadium dat een goede mogelijkheid heeft om uit te groeien tot een volwassen plant, een levensvatbaar embryo is dat gedifferentieerde weefsels bevat waarin zaadlob en wortel te onderscheiden zijn, en dat verder opgekweekt kan worden met behulp van conventionele veredelingstechnieken. Hierbij geldt het torpedovormige stadium bij *Arabidopsis thaliana* als voorbeeld voor de tweezaadlobbigen. Voor eenzaadlobbigen en naaktzadigen wordt een equivalent differentiestadium aangehouden. Op basis van de ervaring van experts blijkt dat er in het genoemde stadium zoveel ontwikkelingsbarrières overwonnen zijn, dat de kans erg groot is dat het embryo uit zal groeien tot een volwassen plant.

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. Drs. H.P. de Wijs
Dr. I. van der Leij

Ontwikkelingsstadia en levensvatbaarheid hybride planten

COGEM advies CGM/100930-01

Inleiding

Planten die zijn vervaardigd door middel van celfusie of protoplastfusie worden aangemerkt als genetisch gemodificeerd organisme (ggo). Deze planten moeten voldoen aan Europese regelgeving voor ggo's, zoals beschreven in Richtlijn 2001/18/EG.¹ De Europese Richtlijn 2001/18/EG is in de Nederlandse wetgeving vastgelegd in het Besluit ggo.² In de ggo-regelgeving is een clause opgenomen over vrijstellingen van de regelgeving.^{3,4,5} Planten vervaardigd met cel- en protoplastfusie kunnen volgens deze clause uitgezonderd worden van de regelgeving, indien de twee ouderplanten kunnen kruisen met behulp van conventionele veredelingsmethoden.

Celfusie en kruisingen hebben beide tot doel waardevolle eigenschappen van de ouderplanten samen te brengen in één plant, de hybride. De essentie van een kruising is de bevruchting van een haploïde eicel door een haploïde spermacel. Celfusie wordt daarentegen geïnduceerd tussen twee gewone (somatische) plantencellen.

Kruisingen komen van nature tussen verwante plantensoorten voor. Veredelaars kunnen met behulp van conventionele veredelingsmethoden, zoals haploïdisatie, voorbehandeling van mannelijke of vrouwelijke bloeddelen en *in vitro* cultuur van embryo's of vruchtbeginsels, soorten met elkaar kruisen waarvan het minder waarschijnlijk is dat zij in de natuur met elkaar zullen of kunnen kruisen.

Adviesvraag

Het ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer (VROM) ontvangt verzoeken van veredelingsbedrijven om celfusie-producten uit te zonderen van de ggo-regelgeving. Van de mogelijkheid tot uitsluiting van celfusie van ggo-regelgeving is in de afgelopen jaren met enige regelmaat gebruik gemaakt. Veredelaars leveren hiervoor gegevens aan die bewijzen dat kruising tussen twee ouderplanten waarmee celfusie is uitgevoerd, mogelijk is. Deze aanvragen worden op een case-by-case basis beoordeeld.

De gegevens die veredelaars overhandigen om een hybride aan te tonen, kunnen verschillen van een analyse van uiterlijk waarneembare kenmerken van een kiemplant tot een analyse van de genetische samenstelling van een uitgerepareerd embryo. Vanuit deze context vraagt het ministerie van VROM advies aan de COGEM over de volgende vraag; vanaf welk stadium van de geslachtelijke voortplanting leert de praktijk dat deze mogelijkheden heeft om uit te groeien tot een volwassen plant?

Eerder advies

De COGEM heeft eerder advies uitgebracht over het bewijsmateriaal dat nodig is om een hybride tussen verschillende plantensoorten aan te tonen.⁶ De nakomeling van een kruising

tussen twee planten kan geanalyseerd worden op uiterlijk waarneembare kenmerken (fenotype) of op de genetische samenstelling van de plant (genotype). In haar advies geeft de COGEM aan dat zowel fenotypische als genotypische analyse sterke aanwijzingen kunnen geven dat een nakomeling van een kruising een hybride is van twee ouderplanten. Echter, door het aantonen van moleculaire merkers van beide ouders in de nakomeling kan volgens de COGEM overtuigend bewezen worden dat de nakomeling een hybride is van de twee ouderplanten.

Achtergrond

Geslachtelijke voortplanting bij zaadplanten

Zaadplanten zijn de groep landplanten die zich via zaden voortplanten. De zaadplanten kunnen worden onderverdeeld in planten met bloemen die bedekte zaden vormen, zoals bij fruitbomen, en planten die kegels hebben met daarin naakte zaden, zoals naaldbomen. In de bloemen of kegels worden mannelijke en vrouwelijke geslachtscellen aangemaakt, in de vorm van pollen met daarin spermacellen en zogenaamde 'zaadknoppen' met daarin eicellen. Pollen wordt bij bedektzadigen geproduceerd in meeldraden, bij naaktzadigen in zakjes op de schubben van de mannelijke kegel. Het pollen kan de zaadknoppen door onder andere wind- of insectenbestuiving bereiken. Bij bedektzadigen komt het pollen op de stempel van de bloem en vormt dan een pollenbuis die naar de zaadknop toegroeit, zodat de spermacellen de eicellen kunnen bevruchten. Bij naaktzadige soorten wordt een pollenbuis gevormd of de spermacellen hebben een staart om zich mee voort te bewegen.

In de pollenbuis bevinden zich twee spermacellen die aparte functies hebben. De eerste spermacel fuseert met de eicel. Bij bedektzadigen fuseert de tweede spermacel met een diploïde cel. Hieruit ontstaat het triploïde 'endosperm', dat voeding levert voor het embryo. Bij naaktzadigen ontstaat het endosperm uit het haploïde weefsel van de zaadknop.

Nadat de bevruchting van de eicel tot een zygote heeft geleid, zal deze gaan delen om een embryo te vormen. Het embryo kent verschillende ontwikkelingsstadia waarin cellen delen, differentiëren en/of zich strekken. Bij de tweezaadlobbigen, waaronder de modelplant *Arabidopsis thaliana*, zijn de kenmerkende embryonale stadia achtereenvolgens bolvormig, hartvormig en torpedovormig. Naast het embryo ontwikkelt ook het triploïde endosperm zich verder en wordt eventueel opgenomen door het embryo.

De zaadknop ontwikkelt zich tot een zaadje met daarin een volgroeid embryo. Gunstige omstandigheden leiden tot kieming van het zaadje. De eerste blaadjes van een kiemplant heten zaadlobben. Hierna worden 'ware' bladeren ontwikkeld die voor de soort kenmerkend zijn. De plant zal hierna nog enige tijd ontwikkelen en doorgroeien. Op een gegeven moment gaat de plant over tot het maken van bloemen of kegels en is de voortplantingscyclus voltooid.⁷

Kruisingsbarrières en veredelings technieken

Veruit de meeste plantensoorten kunnen in het wild niet met elkaar kruisen. Dit is het gevolg van soortbarrières die bestuiving, bevruchting of de ontwikkeling van het embryo tegenhouden.⁸ Door een verschil in bloeiperiode van twee soorten bijvoorbeeld, komen bepaalde kruisingen in de natuur niet voor. Indien bestuiving wel mogelijk is, kan het vrouwelijke voortplantingsorgaan niet receptief zijn voor het pollen, waardoor er geen pollenbuis zal groeien. De fusie van de twee

geslachtscellen kan mislukken doordat de eicel niet receptief is. Ook kan na het ontstaan van de zygote bij celdeling (mitose) een verschil in chromosoomaantal van de ouderplanten correcte paring van de chromosomen in de weg staan. Verder kunnen er in de daaropvolgende stadia van ontwikkeling problemen zijn met celdeling en celdifferentiatie, zodat het embryo stopt met ontwikkelen.

Omdat veredelaars desondanks bepaalde hybrides willen verkrijgen, hebben zij technieken ontwikkeld waarmee kruisingsbarrières overkomen kunnen worden.⁹ Een voorbeeld hiervan is *embryo rescue*, wat toegepast wordt op een embryo in de zaadknop om incompatibiliteit met het endosperm te vermijden. Het embryo wordt hierbij uit de zaadknop verwijderd en op een voedingsmedium doorgekweekt.

Overweging

Het ministerie van VROM heeft gevraagd, vanaf welk stadium van de geslachtelijke voortplanting de praktijk leert, dat een hybride embryo mogelijkheden heeft om uit te groeien tot een volwassen plant. Voor de beantwoording van de adviesvraag neemt de COGEM in haar overweging mee dat conventionele verdelingsmethoden, zoals haploïdisatie en *embryo rescue*, gebruikt mogen worden voor het verkrijgen van een kruisingsproduct. Daarnaast wijst de COGEM erop dat het ministerie van VROM aan de hand van informatie over een kruising tussen twee ouderplanten een afweging moet maken of een celfusieproduct van dezelfde ouderplanten onder de ggo-regelgeving valt of niet.

Het beste bewijs voor de mogelijkheid om uit te groeien tot een volledige plant is de volwassen plant zelf. In de praktijk kan het ontwikkelingspotentieel van een hybride embryo afhankelijk van de oudersoorten en de gebruikte technieken verschillen. De keuze voor een stadium in de ontwikkeling van een plant ter beantwoording van de adviesvraag is daarom deels arbitrair.

Een tweecellig embryo heeft de eerste celdeling vanuit de zygote met succes volbracht. Naarmate het embryo zich verder ontwikkelt, waarbij cellen zich delen en gaan differentiëren en de patroonvorming in het embryo tot stand komt, worden steeds meer barrières in de ontwikkeling overwonnen en kan het embryo meer levensvatbaar genoemd worden (oftewel het embryo heeft meer kans op het uitgroeien tot een volwassen plant). Een kiemplant is dermate ver ontwikkeld, dat deze zich kan handhaven en een zeer grote kans heeft om een volwassen plant te worden onder gunstige condities.

De COGEM is van mening dat een embryo dat gedifferentieerde cellen bevat met een duidelijk verschil in zaadlobben en wortel, een grote kans heeft om zich te ontwikkelen tot een volwassen plant. Het stadium van het embryo dat hierbij als voorbeeld geldt, is het torpedostadium in de ontwikkeling van de tweezaadlobbige *Arabidopsis thaliana*. In dit stadium zijn de cellen begonnen met strekken. Bij andere plantengroepen, zoals eenzaadlobbigen, zal een equivalent differentiatiestadium een goede mogelijkheid hebben om uit te groeien tot een volwassen plant. Op basis van de ervaring van experts blijkt dat er in het genoemde stadium zoveel ontwikkelingsbarrières overwonnen zijn, dat de kans erg groot is dat het embryo met behulp van conventionele verdelingstechnieken uit zal groeien tot een volwassen plant.

Bewijs voor een kruisingsproduct

De adviesvraag is gesteld vanuit de context dat een veredelaar wil aantonen dat een nakomeling van twee ouderplanten een hybride is, om vrijstelling te verkrijgen voor een hybride die verkregen is door protoplast- of celfusie van dezelfde ouderplanten.

De COGEM heeft eerder gesteld dat fenotypische analyse sterke aanwijzingen kan geven om een hybride aan te tonen.⁶ Fenotypische analyse zal slechts in bepaalde ontwikkelingsstadia van de plant succesvol zijn, zoals bij volwassen planten die ‘waar’ blad hebben en in sommige gevallen bij vruchten, kegels of kiemplanten. Embryo’s vertonen hiervoor te weinig onderscheidende soortskenmerken.

De COGEM heeft in haar eerdere advies ook gesteld dat genotypische analyse doorslaggevend is om een hybride aan te tonen.⁶ Een zaadje of een kiemplant bevat doorgaans genoeg plantmateriaal om een DNA-extractie mogelijk te maken en aan de hand van moleculaire merkers na te gaan of de nakomeling DNA heeft geërfd van beide ouders. Met de huidige gevoeligheid van moleculaire technieken kan echter ook een embryonaal stadium in de meeste gevallen genoeg materiaal opleveren om het genotype te bepalen.

Conclusie en advies

De COGEM concludeert dat het stadium dat een goede mogelijkheid heeft om uit te groeien tot een volwassen plant, een levensvatbaar embryo is dat gedifferentieerde weefsels bevat waarin zaadlob en wortel te onderscheiden zijn, en dat verder opgekweekt kan worden met behulp van conventionele veredelings technieken. Hierbij geldt het torpedovormige stadium bij *Arabidopsis thaliana* als voorbeeld voor de tweezaadlobbigen. Voor eenzaadlobbigen en naaktzadigen wordt een equivalent differentiatiestadium aangehouden.

Additionele opmerking

De voorwaarde voor uitzondering van een celfusieproduct van de ggo-regelgeving is dat de ouderplanten kruisbaar zijn met behulp van conventionele verdelingsmethoden. In haar eerdere advies over het bewijs voor een succesvolle kruising heeft de COGEM opgemerkt dat ‘conventionele verdelingsmethode’ geen vaststaande definitie heeft.⁶ Met de voortschrijding van de wetenschap en de tijd kunnen nieuwe en/of verbeterde verdelings technieken het begrip verruimen, waarmee ook de grenzen van kruisbaarheid opgerekt worden. De COGEM gaat in dit advies niet in op de implicaties van de vervaging van de grenzen van de kruisbaarheid voor de ggo-regelgeving, maar beperkt zich tot de adviesvraag.

Referenties

1. 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
2. Besluit genetisch gemodificeerde organismen Wet milieugevaarlijke stoffen: Besluit van 25 januari 1990, tot vaststelling van een algemene maatregel van bestuur krachtens artikel 24 van de Wet milieugevaarlijke stoffen
3. Artikel 3, Annex IB, 2e lid van Richtlijn 2001/18/EG

4. Artikel 3, annex IIA, lid 3 van Richtlijn 2009/41/EG
5. Bijlage 1 behorende bij artikel 23, 2e lid, onder b van Besluit ggo
6. COGEM (2010). Bewijsvoering voor het aantonen van een hybride na kruising van verwante plantensoorten. COGEM advies CGM/100225-02
7. Raven PH *et al.* (1999) *Biology of Plants*. 6th edition. WH Freeman and company publishers, New York
8. Tiffin P *et al.* (2001). Asymmetrical crossing barriers in Angiosperms. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 268: 861-867
9. Jansky S (2006). Overcoming hybridization barriers in potato. *Plant Breeding* 125: 1-12