

Advies betreffende: **Registratie en keuring van hybride rassen met mannelijke steriliteit in *Chichorium intybus* sp. ('lof')**

Kennisgever: **Naktuinbouw**

COGEM kenmerk
CGM/010216-02

BGGO nummer
GGO 00/09

Datum advies
16 februari 2001

Samenvatting

Naktuinbouw vraagt middels deze aanvraag een vergunning voor kleinschalige werkzaamheden op proefvelden en bloeiproeven in kassen in de gemeenten Alkemade en Haarlemmermeer met diverse lof-varianten waarin combinaties van de volgende genen zijn gebracht:

- *barnase* gen, coderend voor een ribonuclease, resulterend in nucleaire mannelijke steriliteit;
- *bar* gen, coderend voor fosphinotricine acetyltransferase, resulterend in ammoniumglufosinaat-resistentie;
- *neo* gen (ook bekend als *nptII*), coderend voor neomycine fosfotransferase, resulterend in kanamycine resistentie.

Doel van de introductie in het milieu is het registreren en keuren van *Cichorium* kruisingen, getransformeerd met constructen voor mannelijke steriliteit, ammoniumglufosinaat-resistentie en kanamycine resistentie. De onderhavige, genetisch gemodificeerde lofplanten zullen tijdens de bloeiperiode op het veld in het vegetatieve stadium blijven. Bloeiproeven worden uitgevoerd in kassen.

De eigenschap van mannelijke steriliteit is ingebracht om het probleem van hoge percentages zelfbestuiving tijdens de productie van hybride zaad van lof te voorkomen. Hierdoor kunnen 100% zuivere hybride rassen geproduceerd worden. De commissie ziet geen reden om aan te nemen dat de ingebrachte genen in *Cichorium intybus*, namelijk *barnase* (mannelijke steriliteit), *bar* en *nptII* (resp. ammoniumglufosinaat- en kanamycine-resistentie), genetisch gemodificeerde *Cichorium intybus* planten een selectief voordeel t.o.v. niet-genetisch gemodificeerde planten zullen geven onder in het natuurlijk milieu voorkomende omstandigheden.

Uitkruising van de ingebrachte eigenschappen wordt voldoende voorkomen door de aard van de modificatie en de werkzaamheden zoals die uitgevoerd zullen worden. Het eventueel toch in de natuur terechtkomen van de eigenschappen zal naar oordeel van de commissie niet leiden tot een verhoogd milieurisico.

Derhalve luidt het advies van de commissie dat er geen bezwaar is tegen uitvoering van het beschreven veldexperiment met genetisch gemodificeerde *Cichorium intybus* planten.

Doel van het onderzoek

Het doel van de aanvraag is het registreren en keuren van hybride lijnen van lof op basis van genetische mannelijke steriliteit, waarmee het probleem van het optreden van hoge percentages zelfbestuiving wordt vermeden. Hierbij zijn niet-gemodificeerde lijnen gekruist met mannelijk steriele genetisch gemodificeerde lijnen.

Aspecten van het gewas

Als uitgangsplantensoort wordt *Cichorium intybus* gebruikt. Deze soort maakt deel uit van de familie van de Compositae. De gangbare Nederlandse naam is lof (groenlof, roodlof en witlof). *Cichorium intybus* is inheems in Nederland en andere Europese landen en wordt aangetroffen in Atlantische, continentale en mediterrane ecosystemen. Van nature komt *Cichorium* voor op braakliggende terreinen en in wegbermen, vooral in het fluviaal district. In natuurlijke ecosystemen is *Cichorium intybus* een meerjarig gewas.

Cichorium intybus plant zich geslachtelijk voort. Meer dan 80% van de kruisbestuiving gebeurt door honingbijen, daarnaast treedt zelfbestuiving op. Windbestuiving treedt niet op. Warm en droog weer geeft een hogere pollenproductie. Bloei-inductie vindt plaats na een koude periode (5°C gedurende vier weken). *Cichorium intybus* vormt pollen, zaden en wortelstokken als overlevings- en verspreidingsstructuren. Zowel in de natuurlijke habitat als in gebieden van introductie loopt de kiemkracht van de zaden terug onder invloed van temperatuur en vochtigheid. De zaden blijven na de bloei in de bloembodem vastzitten en kunnen zich niet over grote afstanden verspreiden.

In Nederland kunnen deze planten kruisen met andere rassen en wilde planten behorende tot *Cichorium intybus*, en met de soort *Cichorium endivia*.

Lof wordt als een tweejarig gewas geteeld. In het eerste jaar blijft de plant vegetatief. In het tweede jaar vindt bloei en zaadontwikkeling plaats. In de praktijkgerichte tuinbouw is men echter alleen geïnteresseerd in het vegetatieve product dat geoogst wordt. In uitzonderingsgevallen kan er bij enkele planten een vroegtijdige aanzet tot bloei optreden, afhankelijk van de klimatologische omstandigheden in het betreffende bloeiseizoen.

Moleculair biologische aspecten

Vectoren en de hierop aanwezige genen

DNA sequenties zijn in het genoom van het gastheerorganisme geïntroduceerd met behulp van transformatie gebaseerd op *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmide vectoren. Een 'disarmed' *Agrobacterium tumefaciens*-stam werd aangewend als transformatievector. Het gebruikte vectorsysteem bestaat uit twee componenten; een niet-oncogeen of 'disarmed' Ti-plasmide dat de genen draagt betrokken bij de genoverdracht van de over te brengen DNA sequenties, en een vector dat te de over te dragen sequenties bevat binnen de T-DNA borders. De vector met daarop de over te brengen DNA sequenties kan intermediair of een binair zijn. In geval van een

intermediaire vector zal er in *Agrobacterium tumefaciens* eerst een integratie plaatsvinden van de intermediaire vector in de 'disarmed' Ti-plasmide dat dan als een acceptor-plasmide dient daar de intermediaire vector niet zelf kan repliceren in *Agrobacterium tumefaciens*. Met deze cointegratie-strategie worden DNA sequenties gelegen binnen de T-DNA borders vanuit dit cointegraat overgebracht naar de plant. Een binaire vector kan repliceren in zowel *Escherichia coli* als *Agrobacterium tumefaciens*. Het DNA gelegen binnen de T-DNA borders van de vector wordt direct overgebracht naar de plant vanuit de *Agrobacterium tumefaciens* bacterie met daarin een 'disarmed' Ti-plasmide. De vector pTTM8RE is als intermediaire vector en pTCO60 als binaire vector gebruikt.

De vectoren bevatten buiten de T-borders genen die resistentie verlenen aan ampicilline (*Amp*), streptomycine/spectinomycine (*Sm/Sp*) ten behoeve van selectie en vermeerdering in bacteriën. Daar deze genen buiten de T-DNA borders liggen zullen ze normaliter niet worden overdragen naar het genoom van de plantencel tijdens de genetische modificatie. Bovendien zijn deze genen alleen werkzaam in bacteriën en niet in plantencellen.

Beschrijving van de te introduceren genen

Voor de modificatie zijn de plasmiden pTTM8RE en pTCO060 gebruikt die beiden de drie toe te passen elementen bevatten. De gebruikte genetische elementen zijn in detail beschreven.

- *neo*, (ook bekend als *nptII*) afkomstig van Tn5, coderend voor neomycine fosfotransferase, dat kanamycine-resistentie verleent, onder regulatie van de nopaline synthase (*nos*) promoter en de 3' octopine synthase (*ocs*) terminator, die beide afkomstig van *Agrobacterium tumefaciens* zijn. Het *neo* gen wordt gebruikt als selecteerbare merker om efficiënte selectie van genetisch gemodificeerde cellen in de weefselkweekfase mogelijk te maken.
- *bar*, afkomstig uit *Streptomyces hygrosopicus*, coderend voor phosphinotricine acetyltransferase, dat ammoniumglufosinaat-resistentie verleent, onder regulatie van een promoter, afgeleid van ribulose-1,5-biphosphate carboxylase small subunit genes, afkomstig van *Arabidopsis thaliana*, en de 3'gen 7 terminator afkomstig van *Agrobacterium tumefaciens*.
Het *bar* gen wordt in deze modificatie gebruikt als een selectie-merker in de plant bij het screenen van de hybriden op de aanwezigheid van de nieuw ingebrachte eigenschappen. Deze hybriden zijn ontstaan uit kruisingen van genetisch gemodificeerde planten met niet-gemodificeerde planten. Het herbicide waartegen de planten resistent zijn gemaakt zal slechts op kleine schaal toegepast worden bij de productie van hybride zaad, en wel voor het verkrijgen van 100% zuiver hybride zaad
- *barnase*, afkomstig uit *Bacillus amyloliquefaciens*, coderend voor een ribonuclease onder regulatie van de pTA29 promoter afkomstig uit *Nicotiana tabacum* (tabak). Hierdoor is er weefsel-specifieke genexpressie van *barnase* in tapetumcellen, hetgeen resulteert in mannelijke steriliteit. Als terminator is gebruikt de 3'nopaline synthase (*nos*) terminator, afkomstig van *Agrobacterium tumefaciens*.

Het plasmide pTCO60 is identiek aan plasmide pTTM8RE met dien verstande dat het ook het *barstar* gen bevat. Dit *barstar* gen codeert voor een specifieke inhibitor van de

ribonuclease gecodeerd door het *barnase* gen. Het *barstar* gen ligt echter buiten de T-DNA borders waardoor het niet waarschijnlijk is dat planten gemodificeerd m.b.v. pTCO60 dit gen bevatten.

Risicoaspecten van de methode van vervaardiging

Met *Agrobacterium tumefaciens* gemedieerde transformatie van planten worden DNA sequenties gelegen binnen de T-DNA borders geïntegreerd in het genoom van de plantencel. Statistisch gezien, blijkt dat het DNA snel in de kern terechtkomt en daar op een schijnbaar willekeurige plaats in het genoom integreert. Op de plaats van integratie kunnen meerdere kopieën van het T-DNA in tandem of in omgekeerde herhaling worden aangetroffen. In ongeveer 30 procent van de cellen blijkt het T-DNA op twee of drie integratieplaatsen aanwezig te zijn. Het is mogelijk dat integratie(s) plaatsvindt in een functioneel gen dat daarmee zijn functie verliest. Bij de gebruikte genetische modificatie is het ook mogelijk dat slechts een deel van het over te brengen DNA in het genoom integreert. In het geval dat het construct slechts gedeeltelijk integreert bestaat de mogelijkheid tot vorming van onbedoelde chimaere genproducten. Echter in geval van kleinschalige proeven waarbij geen sprake is van consumptie of vervoeding worden eventuele risico's die deze chimaere genproducten met zich meebrengen niet in beschouwing genomen.

Karakterisatie van het (potentieel) overgebrachte DNA

Het gedeelte tussen de T-DNA borders is zodanig gekarakteriseerd dat het voldoet aan de criteria zoals die vereist zijn voor klasse 3 werkzaamheden. De COGEM heeft in een eerder advies deze criteria opgesteld (CGM/990518-41). Van de gebruikte constructen is bovendien exact bekend welke elementen zich op de plasmiden bevinden. Op basis van fenotypische bepalingen van de genetisch gemodificeerde lofplanten kan geconcludeerd worden dat de genen tussen de T-DNA borders stabiel in het genoom zijn geïntegreerd. Tevens blijkt er op basis van resultaten uit eerdere proeven ten behoeve van evaluatie van de field performance van vergelijkbare mannelijk steriele genetisch gemodificeerde *Cichorium* planten (o.a. BGGO 94/23), dat deze planten vanwege de genetische modificatie niet schadelijk zijn geworden voor mens of milieu.

Interactie gewas en construct/transgenen

Beschrijving van het GGO

Als gevolg van de modificatie zijn genetisch gemodificeerde lofplanten in vergelijking tot niet-gemodificeerde lofsoorten resistent tegen het antibioticum kanamycine en het systemisch herbicide ammoniumglufosinaat, en nucleair mannelijk steriel.

Interactie van het GGO met het milieu

- *nptII*: De aanwezigheid van het *nptII* gen zal naar het oordeel van de commissie niet leiden tot een selectief voordeel voor genetisch gemodificeerde *Cichorium intybus* planten onder zowel natuurlijke als teeltomstandigheden. Zowel COGEM als RIKILT gaan bij de beoordeling van de veiligheid van het gebruik van antibioticum-resistentiegenen (inclusief *nptII*) in planten er vanuit dat het risico van deze genen gelegen is in het feit dat door horizontale genoverdracht tussen planten en micro-organismen, pathogene micro-organismen resistent kunnen worden tegen antibiotica. Tevens wordt beoordeeld of dit milieutechnisch een verhoogd risico is. De eerste vraag die tijdens de risicoanalyse opkomt is de vraag hoe groot de kans op de feitelijke horizontale genoverdracht daadwerkelijk is. Hierover zijn geen experimentele gegevens beschikbaar, wel is duidelijk dat de mogelijkheid van overdracht bestaat maar dat de frequentie zeer laag zal zijn. Deze genen zullen daarnaast steeds weer opnieuw ontstaan door het natuurlijke proces van mutatie. De frequentie van reeds aanwezige kanamycine-resistentie in micro-organismen in de bodem of in de darmflora van mens en dier zal langs deze weg daarom niet noemenswaardig toenemen. In een gezamenlijk advies van COGEM en RIKILT wordt de Minister van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieu geadviseerd het gebruik van *nptII* ook in de toekomst toe te blijven staan (CGM/000918-01).
- *bar*: Resistentie tegen ammoniumglufosinaat (en herbicide-resistentie in het algemeen) zal naar het oordeel van de commissie niet leiden tot een selectief voordeel van de transgene plant of zijn kruisingsproducten. Dit standpunt is vastgelegd in een signalerende brief (CGM/921109-11) en is bevestigd in alle adviezen daarna waarin werkzaamheden met genetisch gemodificeerde herbicide-resistente planten werden aangevraagd. Het herbicide waartegen de planten resistent gemaakt zijn zal in de praktijk slechts op kleine schaal toegepast worden en wel bij de productie van hybride zaad, voor de verkrijging van 100% zuiver hybride zaad. Toepassing van het herbicide in de teelt van de hybride is niet zinvol omdat bij bespuiting met het herbicide de helft van de te verkopen hybride zaailingen dood zou gaan.
Wel signaleert de commissie dat de aanvrager toestemming moet hebben van het CTB voor het gebruik van ammoniumglufosinaat tijdens de hybride zaadproductie.
- *barnase*: De aanwezigheid van het gen coderend voor mannelijke steriliteit zal naar het oordeel van de commissie de *Cichorium intybus* planten geen selectief voordeel geven. Mannelijke steriliteit komt in een aantal plantensoorten voor. Het is één van de mechanismen waarmee zelfbevruchting wordt voorkómen. Geforceerde zelfbevruchting kan resulteren in inteeltdepressie. De hoeveelheid mannelijk steriele planten in een wilde populatie is het gevolg van een balans tussen het fitness-voordeel van het voorkómen van inteeltdepressie en het fitness-nadeel dat slechts de helft van de gameten wordt verspreid. Uit eerdere proeven blijkt dat genetisch gemodificeerde planten 100% mannelijk steriel zijn en dat de eigenschap minimaal 3 generaties stabiel Mendeliaans overerft.

Risicoaspecten van het GGO

Uitkruising van de ingebrachte eigenschappen naar niet-gemodificeerde *Cichorium intybus* planten of de wilde *Cichorium* kan direct plaatsvinden, maar ook indirect via verwanten (*Cichorium endivia*) die eventueel wordt verbouwd in de omgeving van de veldproef.

Onder normale teeltomstandigheden zal in het veld echter geen bloei plaatsvinden vanwege de tweejarigheid van het gewas. In geval bloei geïnduceerd wordt zal dit uitgevoerd worden in kassen, hetgeen een fysieke inperking met zich meebrengt. Wanneer bij het verwerken van transgeen zaad onzorgvuldig wordt omgegaan met het afval dat tijdens deze werkzaamheden gevormd wordt, bestaat de mogelijkheid van ongecontroleerde verspreiding van GGO's naar plaatsen waar normaliter geen bestrijding van opslag of onkruid wordt uitgevoerd.

- *nptII*: Theoretisch is het mogelijk dat via horizontale gen-overdracht het *nptII* gen overgedragen wordt aan micro-organismen in de bodem en daar tot expressie kan komen. De frequentie van reeds bestaande kanamycine-resistentie in micro-organismen in de bodem zal langs deze weg niet essentieel verhoogd worden. Tevens bestaat de mogelijkheid dat het *nptII* gen vervolgens wordt overgedragen naar micro-organismen in de darmflora van mens en dier en daar tot expressie kan komen. Ook hier geldt dat dit de frequentie van reeds bestaande kanamycine-resistentie in micro-organismen in de darmflora niet noemenswaardig toeneemt. De klinische relevantie van kanamycine en neomycine is, voor humane toepassingen vrijwel volledig verdrongen door nieuwere generaties antibiotica, alleen nog beperkt relevant in veterinaire toepassingen. In de onderhavige aanvraag betreft het echter geen vervoeding noch consumptie.
- *bar*: Het eventueel in de natuur terechtkomen van ammoniumglufosinaat-resistentie kan in theorie leiden tot het ontstaan van een onbeheersbaar kruid. Echter, aangezien de eigenschap aan de planten geen selectief voordeel geeft, omdat normaliter ammoniumglufosinaat buiten de akkers niet zal worden toegepast. Dit is conform het standpunt van de COGEM zoals geformuleerd in de signalering CGM/921109-11.
- *barnase*: Vanuit volledig mannelijk steriele planten kan geen verspreiding van eigenschappen plaatsvinden naar kruisbare verwanten. Indien de planten in het veld echter niet 100% mannelijk steriel zijn, kan het transgene kenmerk nucleaire mannelijke steriliteit (NMS) uitkruisen naar kruisbare verwanten. Het eventueel in de wilde flora vestigen van NMS zal naar het oordeel van de commissie niet leiden tot een selectief voordeel of nadeel voor de wilde planten in de zin dat de grootte van de wilde populatie blijvend zal worden beïnvloed. Er zal hooguit sprake zijn van een bepaalde fluctuatie in de grootte van de populatie. De aanvrager heeft experimentele gegevens overlegd waaruit blijkt dat de genetisch gemodificeerde *Cichorium* planten 100% mannelijk steriel zijn.

Eerdere beoordelingen

Handelingen met genetisch gemodificeerde plantlijnen, waaronder *Cichorium intybus*, zijn reeds eerder geëvalueerd en toegestaan. Vergelijkbare planten met daarin de gebruikte constructen pTTM8RE en pTCO60 zijn toegelaten in het kader van veldproefaanvragen BGGO 92/13, 93/06, 93/16 en 94/23, en marktaanvragen C/NL/94/25 en C/NL/96/05. Handelingen met *Cichorium intybus* waarin dezelfde genetische elementen zijn ingebracht zijn ook vergund in BGGO 98/22. De gebruikte genen zijn ook ingebracht in andere plantensoorten. Plantlijnen met onder andere het *bar*-gen zijn reeds eerder geëvalueerd en toegestaan ; ondermeer in het kader van marktaanvragen, C/FR/95/12-07 (mais) en C/UK/95/95/M5-1 (koolzaad). Handelingen met plantlijnen met onder andere het *barnase*-gen zijn toegestaan in het kader van marktaanvragen C/FR/95/05/0A en C/UK/94/M1-01 (koolzaad). Voor het gebruik van het *nptII* gen is de algemene wetenschappelijke opvatting dat het op verantwoorde wijze kan worden toegepast als selectiemerker in genetisch gemodificeerde planten bij introductie in het milieu. Handelingen met plantlijnen met daarin onder andere het *nptII* gen zijn reeds veelvuldig geëvalueerd en toegestaan in het kader van nationale en internationale veldproef- en marktaanvragen.

Beschouwing en risicoanalyse

Schaal van het experiment

Het betreft hier een klasse 3 veldexperiment volgens de indeling zoals die is geformuleerd in het COGEM-advies CGM/990518-41. Dit houdt in dat de jaarlijkse maximale omvang van de proef in totaal 5 hectare is, verspreid over maximaal 10 locaties. Verspreiding hoeft niet voorkomen te worden, maar geproduceerde genetisch gemodificeerde planten worden wel apart gehouden. Er wordt in de risico-analyse derhalve rekening gehouden met de mogelijkheid van uitkruising; effecten zijn eventueel niet beperkt tot het proefobject. Echter, daar het hier kleinschalige werkzaamheden betreft zullen eventuele effecten gering zijn. Uit experimentele gegevens van voorgaande veldproeven blijkt dat met de eerdergenoemde constructen genetisch gemodificeerde *Cichorium intybus* planten of zijn nakomelingen, vanwege de genetische modificatie, niet schadelijk zijn voor mens en milieu.

Lokatie specifieke aspecten

De genetisch gemodificeerde *Cichorium intybus* planten zijn 100% mannelijk steriel. Daarbij worden eventuele vroeg schietende planten in het veld verwijderd voordat bloeistadium wordt bereikt verwijderd en vernietigd. Het risico dat de ingebrachte eigenschappen uitkruisen naar andere wilde varianten van *Cichorium* of *Cichorium intybus* cultuurrassen is vanwege deze redenen uitgesloten. De zaadvermeerdering wordt uitgevoerd in kassen wat op zichzelf een fysieke inperking vormt. Wilde varianten van *Cichorium* komen vrij algemeen voor op braakliggende terreinen en in wegbermen, met name in het fluviatiel district. Ook de teelt van *Cichorium intybus* rassen vindt plaats in heel Nederland. Derhalve zijn er geen gebieden in

Nederland aan te wijzen waar de kans op uitkruising van de nieuw ingebrachte eigenschappen naar andere *Cichorium* planten groter dan wel kleiner is.

Monitoring

Op het veld zal onder standaard teeltcondities geen bloei optreden vanwege de tweejarigheid van het gewas. Indien er toch schieters tot bloei komen zal de kans op uitkruising van de nieuw ingebrachte eigenschappen nihil zijn vanwege het feit dat het *barnase* gen 100% nucleaire mannelijk steriliteit tot gevolg heeft. Monitoring voor opslag op en/of om het proefobject is dan ook niet vereist. Planten zullen alleen in kassen tot bloei komen. Echter de kassen vormen op zichzelf een fysieke inperking. Specifieke eisen ten aanzien van monitoring zijn dan ook niet vereist. Eventuele op het veld aanwezige vroeg schietende planten zullen voordat het bloeistadium wordt bereikt worden verwijderd en vernietigd. Genoverdracht via pollenverpreiding wordt daarom verwaarloosbaar geacht.

Afvalverwerking

Na afloop van de experimenten zullen eerst alle planten worden kapot gefreesd en daarna worden ondergeploegd. Vooral het kapotfreen heeft tot gevolg dat de planten snel worden aangetast door saprofytische schimmels en bacteriën. Als het gewas na het frezen wordt ondergeploegd zal verdere afdoding tijdens de winter volgen. Deze methode wordt standaard toegepast na beëindiging van alle lofproefvelden. Ook in het normale veredelingsproces moet vermenging van verdelingslijnen ten alle tijden worden voorkomen. Deze maatregelen zijn afdoende om verspreiding via vegetatieve delen van de plant te voorkomen.

Vervoeding

Er zal geen vervoeding van genetisch gemodificeerd materiaal plaatsvinden.

Incidentele consumptie

Er zullen geen consumptieproeven met genetisch gemodificeerd materiaal plaatsvinden.

Aanvullende eisen

De ingebrachte genen zelf vormen geen aanleiding voor additionele maatregelen. Daar de genetisch gemodificeerde *Cichorium intybus* planten mannelijk steriel zijn, er in de standaard teeltpraktijk geen bloei op zal treden, en de aanvrager aangeeft vroeg schietende planten te verwijderen is de commissie van mening dat er geen additionele maatregelen vereist zijn om verspreiding te voorkomen.

Conclusies en Advies

Al het voorgaande in overweging nemende is de commissie van oordeel dat uitkruising van de nieuw ingebrachte eigenschappen in *Cichorium intybus*, namelijk mannelijke steriliteit en kanamycine- en ammoniumglufosinaat-resistentie, voldoende wordt voorkomen door de aard van modificatie en de werkzaamheden zoals die uitgevoerd zullen worden. Het eventueel toch in de natuur terechtkomen van de eigenschappen zal naar oordeel van de commissie niet leiden tot een verhoogd milieurisico.

Het advies van de commissie luidt dat er geen bezwaar is tegen uitvoering van het beschreven veldexperiment met genetisch gemodificeerde *Cichorium intybus* planten.