

Advies betreffende: **Kleinschalige teelt van transgene *Lolium perenne* L. (Engels raaigras)-planten met ingebrachte bloeivertraging**

Kennisgever: **Advanta Seeds B.V.**

COGEM kenmerk  
**CGM/010319-01**

BGGO nummer  
**GGO 00/07**

Datum advies  
**19 maart 2001**

## Samenvatting

Advanta Seeds BV vraagt middels deze aanvraag een vergunning voor kleinschalige werkzaamheden op proefvelden in de gemeente Reimerswaal met Engels raaigras waarin de volgende genen zijn ingebracht:

- *LQIMath* gen, coderend voor een genfactor, resulterend in bloeivertraging;
- *hph* gen (ook bekend als *hyg*), coderend voor hygromycine phosphotransferase, dat hygromycine resistentie verleent.

Door de modificatie zal in de genetisch gemodificeerde *Lolium*-planten een bepaalde waargenomen lichtkwaliteit worden omgezet in een signaal dat uiteindelijk leidt tot bloeivertraging. Het doel van de veldproef is het evalueren van deze genetisch gemodificeerde *Lolium*-planten onder veldomstandigheden. Er worden geen vervoeding of consumptieproeven voorzien.

*Lolium perenne* (Engels raaigras) komt zeer algemeen voor in de Nederlandse flora. Daarbij komen in de Nederlandse flora diverse andere *Lolium*-soorten voor waarmee de uitgangsoort kan uitkruisen.

Het *LQIMath* gen codeert voor een eiwit dat een schakel vormt binnen de expressieketen tussen het door de plant waarnemen van een 'kwaliteit' van licht, en het omzetten van dit opgevangen signaal in een beïnvloeding van het expressiepatroon van andere genen die betrokken zijn bij de overgang van vegetatief groeiende planten naar generatief groeiende planten. Door het tot expressie brengen van het *LQIMath* eiwit in *Lolium* zal de plant geen bloeistengels produceren met als gevolg een verlenging en/of intensivering van de vegetatieve groeifase. *Lolium*-planten met deze nieuwe eigenschap kunnen derhalve een verhoogde vegetatieve fitness hebben gekregen.

Het algemeen voorkomen van de uitgangsoort in Nederland samen met het beoogde effect van de genetische modificatie en de onduidelijkheid over eventuele neveneffecten geeft de noodzaak aan dat vooralsnog alle vormen van verspreiding dienen te worden voorkomen.

Derhalve luidt het advies van de commissie dat er geen bezwaar is tegen uitvoering van het beschreven veldexperiment met genetisch gemodificeerde *Lolium perenne* planten onder voorwaarde dat het veldexperiment wordt uitgevoerd met inachtneming van de additionele voorschriften zoals die geformuleerd zijn in het onderstaande onderdeel 'Aanvullende eisen'. Het betreft een toestemming voor klasse 1 werkzaamheden (op

maximaal 1 locatie van maximaal 0,1 hectare). De veldproef wordt met inachtneming van de aanvullende eisen op een wijze uitgevoerd waarbij uitkruising en/of vegetatieve verspreiding van de nieuw ingebrachte eigenschappen in *Lolium perenne*, namelijk de hygromycine-resistentie en de ingebrachte bloeivertraging, voldoende kan worden voorkomen en die bovendien hanteerbaar is.

## **Doel van het onderzoek**

Het doel van de aanvraag is het evalueren onder veldomstandigheden van genetisch gemodificeerde *Lolium perenne* planten met ingebrachte bloeivertraging. Door onder meer de invloed van het gebruikte kunstlicht op lichtkwaliteitsfactoren in groeikamers en plantenkassen kan de fenotypische expressie van de ingebrachte eigenschappen enkel beoordeeld worden onder veldomstandigheden.

## **Aspecten van het gewas**

*Lolium perenne* is een zeer algemene plantensoort in zowel cultuurweiden en – grasvelden als daarbuiten. Europa, Aziatische gebieden met een gematigd klimaat en Noord-Afrika staan bekend als genencentra. *Lolium perenne* is een kortlevende overblijvende kruidachtige plant met een levensduur van 3 tot 5 jaar. De planten vertonen binnen natuurlijke ecosystemen een generatietijd van zaad tot zaad van één jaar, verdeelt over twee groeiseizoenen. Onder bepaalde omstandigheden kan echter al bloei optreden in hetzelfde jaar. In de winter sterft de plant tot de grond af, en in het voorjaar groeit de plant weer uit en komt vanaf april tot aan de herfst tot bloei. In cultuur weilanden blijkt dat in sommige winters een dermate hoog percentage van de planten dood kan gaan, dat herinzaai noodzakelijk is. In natuurlijke graslanden is, wanneer een groot gedeelte van de planten 's winters is uitgevallen, voldoende kiemkrachtig zaad in de bodem aanwezig om van daaruit het plantbestand te herstellen.

In cultuur maakt *Lolium perenne* deel uit van meerjarige weiden, velden t.b.v. het maaien van in te kuilen gras, hooivelden, sportvelden of begroeningspercelen, of als groenbemester. Afhankelijk van het gebruiksdoel waarop veredeld is kunnen cultuurrassen onder Nederlandse condities in de regel vanaf de tweede helft van april in bloei schieten. Mede afhankelijk van het maairegime en het weer kan de laatste bloei tot ongeveer eind augustus optreden.

Het klimaat en met name de temperatuur is van bepalende invloed op de voortplanting.

*Lolium perenne* is vernalisatiebehoefstig, zonder een koude-periode te hebben doorgemaakt schieten de planten bij het langer worden van de dagen niet in bloei. Afhankelijk van de weersomstandigheden in het betreffende seizoen bedraagt de tijdsperiode tussen het eerste teken van bloemstengelvorming (stengelstrekking) en de feitelijke bloei (het vrijkomen van stuifmeel) 4 tot 6 weken. *Lolium perenne* plant zich geslachtelijk voort. Bij de bestuiving is de factor wind van het grootste belang. Vanwege een in de regel hoge mate van zelf-incompatibiliteit is *Lolium perenne* overwegend kruisbevruchtend.

Met betrekking tot de overleving is van belang dat *Lolium perenne* niet volledig winterhard is. In sommige koude winters kan dit het plantbestand drastisch reduceren. Verder kan dit gewas niet goed tegen hitte. Als gevolg van de gevoeligheid voor extreme

temperaturen is de soort niet ruim vertegenwoordigd buiten de gematigde klimaatgebieden. De maaiactiviteiten van mens, alsmede begrazing door vee of rijshade onder natte omstandigheden kunnen plaatselijk tot plantuitval leiden, dus een verminderde overleving. *Lolium perenne* is tevens gevoelig voor een aantal schimmelziekten en plagen door verscheidene insecten.

Ten aanzien van de verspreiding spelen zowel abiotische factoren als biotische factoren een rol. Als abiotische factor voor verspreiding is wind de belangrijkste factor. Voor grassen zijn de zaden tamelijk groot (lengte 5 tot 8 millimeter, doorsnede 1 tot 1,5 millimeter), maar desalniettemin bedraagt het duizendkorrelgewicht slechts rond de 2 gram en worden de zaden gemakkelijk verspreid. Als biotische factoren kan genoemd worden de zaadverspreiding via verkleving aan poten, vacht, gebruiksvoorwerpen, schoeisel of gerichte zaai.

Stuifmeel, zaden en wortelstelsel met wat afgetopte stengels en bladeren kunnen als overlevings- en verspreidingsstructuren dienen. Daarnaast kunnen de planten zich door scheuring verspreiden, of kunnen onder grond bedolven scheuten na enige tijd even verderop boven de grond komen (*Lolium perenne* kent geen echte uitlopers). In dit verband is het van belang rekening te houden met het feit dat planten van *Lolium perenne* na 'fragmenteren en onderwerken', een voorschrift dat in veel beschikkingen voor teelt van transgene gewassen staat opgenomen, hun scheuten weer kunnen doen uitlopen.

In zowel hun natuurlijke habitat als in het gebied van introductie kiemen zaden van *Lolium perenne* meestal vrijwel direct nadat zij in de zomer of herfst op de grond zijn gevallen. Het ontbreken van kiemrust maakt de zaden die boven op de grond terechtkomen tamelijk onbestendig als overwinteringstructuur. Zaden die dieper in de bodem, in de bouwvoor, terechtkomen, kunnen jaren later alsnog kiemen indien, als gevolg van mechanische of biologische activiteit, de zaden weer dichterbij het grondoppervlak komen. Van de zaden die onder de bouwvoor terecht zijn gekomen zal de fractie kiemkrachtige zaden in de tijd afnemen met een snelheid die afhangt van de omstandigheden, met name grondwaterpeil of de zuurstofspanning in het algemeen. Vanuit de zaadbank kan een bepaalde fractie zaden alsnog kiemen, ook als zij pas na enkele tot tientallen jaren dichterbij het bodemoppervlak komen. De planten doorstaan de winters in de vorm van de graspol zelf, waarvan in de winter het grootste deel van stengels en bladeren is afgestorven. Ook vanuit gescheurd en ondergewerkt of vertrapt en met bodem bedekte grasplanten kan in het daaropvolgende voorjaar hergroei en de vorming van nieuwe uitlopers plaatsvinden. Het stuifmeel van grassen is licht en klein en daardoor in de regel sterk gevoelig voor uitdroging. Stuifmeel van grassen is daardoor in de regel ongeschikt om langer dan enkele uren te overleven.

*Lolium perenne* kan kruisen met andere *Lolium*-soorten zoals *L. rigidum*, *L. multiflorum* (zowel de meerjarige typen (Italiaans raaigras), al de éénjarige typen (Westerwolds raaigras)), *L. loliaceum*, *L. remotum* (Vlasdolik), *L. temulentum* (Dolik), en daarnaast met *Festuca pratensis*, *F. arundinacea* (Rietzwenkgras), *F. heterophylla*, *F. rubra* (Rood zwenkgras), *F. gigantea* (Reuzenzwenkgras).

## Moleculair biologische aspecten

### Vectoren en de hierop aanwezige genen

Bij de genetische modificatie zijn 3 verschillende vectoren gebruikt. Vector pVDH636 is afgeleid van pUC18/19. Vector pVDH633 is afgeleid van pUC12 die vergelijkbaar is met pUC18/19, maar een andere 'multiple cloning site' bevat. Vector pVDH410 is afgeleid van pGEM-5Zf(+) maar bevat in essentie dezelfde genetische elementen als de andere twee cloneringsvectoren. De lacZa-regio fungeert als microbiële insertiemerker en is tevens de plaats het op het genoom van plantencellen waar het over te dragen DNA wordt geïnserteerd. Verder bevatten de vectoren een replicatiebegin waardoor het gastheerbereik waarin de vectoren zich kunnen repliceren zich beperkt tot *Escherichia coli*. De gebruikte vectoren bevatten een ampicilline-resistentie (aangeduid met AmpR of bla) die bacteriën waarin de beschreven vectoren zich bevinden resistentie verschaft tegen ampicilline en qua moleculaire structuur daarmee sterk verwante andere antibiotica. Het ampicilline resistentie gen komt alleen tot expressie in bacteriën en niet in planten.

### Beschrijving van de te introduceren genen

Voor de modificatie zijn de plasmiden pVDH410 en pVDH633 of pVDH636 gebruikt. Plasmide pVDH636 bevat de genconstructen met de *hph* en *LQIMath* genen. Plasmide pVDH410 bevat enkel het *hph* gen en pVDH633 alleen het *LQIMath* gen. Echter de opbouw van de genconstructen zijn identiek.

Het *LQIMath* genconstruct bestaat uit:

- een constitutieve promoter afkomstig van het ubiquitine gen, inclusief de daarmee geassocieerde exon-intron-sequentie afkomstig uit *Zea mays* (maïs), samen aangeduid als pUbi(mz)ex/in;
- een uit *Arabidopsis thaliana* (zandraket) afkomstig gen, aangeduid als *LQIMath*, dat de verwerking door de plant van informatie over de lichtkwaliteit zodanig wijzigt dat het induceren van de generatieve fase wordt verminderd en/of vertraagd;
- een terminator (tNOS) van het nopalinesynthase gen van het Ti-plasmide uit *Agrobacterium tumefaciens*.

Het *hph* genconstruct bestaat uit:

- een constitutieve, niet-weefsel-specifieke promoter (pACT1) afkomstig van het actine gen van *Oryza sativa* (rijst) inclusief de daarmee geassocieerde exon-intron-sequentie;
- een hygromycine-resistentie gen (*hph*) coderend voor hygromycine fosfotransferase afkomstig uit *Escherichia coli*;
- een terminator (t35S) afkomstig van het 35S RNA gen van bloemkoolmozaïkvirus.

### Risicoaspecten van de methode van vervaardiging

De DNA-sequenties zijn in het genoom van het gastheerorganisme geïntroduceerd met behulp van een particle inflow gun. Hiervoor is een embryogene suspensie cultuur beschoten met goud partikels gecoat met plasmide-DNA zonder additioneel carrier-DNA. Tijdens de modificatie is gewerkt met of één plasmide (pVDH636) met daarop beide

genconstructen of twee afzonderlijke plasmiden met daarop gescheiden de beide te introduceren genconstructen (pVDH410 met het hph-gen en pVDH633 met het *LQ/Math*-gen). Het gebruik van twee losse vectoren voor enerzijds het agronomisch kenmerk en anderzijds de selectiemerker beoogt de frequentie van uitmending van het antibioticum-resistentiegen te bevorderen. Hierdoor zal dit commercieel minder gewenste gen niet langer aanwezig zijn in het materiaal waarvoor te zijner tijd eventueel een marktoelating- of soortgelijke procedure zal worden doorlopen.

Van deze methode van genetische modificatie is bekend dat het percentage van co-expressie van het niet-selectiegen lager is dan bij constructen geïntroduceerd met behulp van *Agrobacterium tumefaciens* en meer afhankelijk van het gebruikte promoter-element. Integratie van de genen in het genoom van plantencellen vindt meestal plaats op een enkele locus met meerdere geïntegreerde kopieën. Het aantal kopieën kan variëren tussen 2 en meer dan 20. Statistisch gezien blijkt dat het DNA op een schijnbaar willekeurige plaats in het genoom van de plantencellen integreert. Het is mogelijk dat integratie(s) plaatsvindt in een functioneel gen dat daarmee zijn functie verliest. Of dat het juist achter een promotor van een plantengen integreert hetgeen de expressie van de nieuwe ingebrachte eigenschap kan beïnvloeden. Bij de gebruikte genetische modificatie is het ook mogelijk dat slechts een deel van het te over brengen DNA in het genoom integreert. Soms kunnen zulke kleine DNA sequenties in het genoom integreren die te klein zijn om nog functioneel te zijn. Men spreekt dan van zogenaamde 'splinters'. In het geval dat het construct slechts gedeeltelijk integreert bestaat de mogelijkheid tot vorming van onbedoelde chimaere genproducten.

Uit genetische studies blijkt dat de geïntroduceerde eigenschappen in 70% van de gevallen Mendeliaans overerven als een enkele locus. In veel gevallen was de expressie van de nieuwe eigenschappen goed voorspelbaar. Echter, als gevolg van aanwezigheid van meerdere kopieën is 'transgene silencing' alswel een verminderde overerving naar nakomelingen waargenomen.

Echter in het geval van kleinschalige proeven waarbij geen sprake is van consumptie of voeding worden eventuele risico's ten aanzien van deze mogelijke effecten niet in beschouwing genomen, omdat er door de schaal van het experiment geen significante effecten te verwachten zijn.

### **Karakterisatie van het (potentieel) overgebrachte DNA**

De gebruikte vectoren zoals die gebruikt zijn voor de genetische modificatie zijn zodanig gekarakteriseerd, alle elementen zijn beschreven en daarnaast zijn de vectorkaarten gegeven, dat ze voldoen aan de criteria zoals die vereist zijn voor klasse 1 werkzaamheden waarbij eventuele effecten beperkt blijven tot het proefobject. De COGEM heeft in een eerder advies deze criteria opgesteld (CGM/990518-41). Tijdens de transformatieprocedure zijn hele plasmiden gebruikt. Hierdoor moet rekening worden gehouden met de mogelijkheid dat naast de genconstructen voor bloeivertraging en hygromycine resistentie ook delen van de 'backbone' van de vector, zoals bijvoorbeeld het ampicilline resistentie gen, in het genoom van de plantencellen is geïntegreerd.

Het hygromycine-resistentiegen (hph) en het agronomisch relevante gen (*LQ/Math*) komen constitutief tot expressie in de plant, het ampicilline-resistentie-gen kent prokaryote genexpressiefactoren en komt niet tot expressie in de plant. De expressie van het hygromycine-resistentie-gen bleek tijdens de weefselkweekfase voldoende hoog om

selectie op hygromycine-houdende media mogelijk te maken. Het niveau van expressie van het *LQIMath* gen uit zich fenotypisch. Onder kasomstandigheden bleken genetisch gemodificeerde *Lolium*-planten zich uitsluitend vegetatief te ontwikkelen. Er is niet bekend of tijdens deze experimenten genetisch gemodificeerde *Lolium*-planten zijn aangetroffen die geen bloeivertraging vertonen. Evenmin zijn selectiecriteria bekend op basis waarvan de op het veld uit te zetten gemodificeerde *Lolium*-planten zijn geselecteerd. Afgezien van de verwachte effecten van de modificatie is het *LQIMath* gen nauwelijks functioneel gekarakteriseerd.

## **Interactie gewas en construct/transgenen**

### **Beschrijving van het GGO**

Als gevolg van de modificatie zijn de genetisch gemodificeerde *Lolium*-planten in vergelijking tot niet-gemodificeerde *Lolium*-planten resistent tegen het antibioticum hygromycine en vertonen de planten een verminderde en/of vertraagde bloei. Tot dusverre zijn de gemodificeerde planten met inzet van extra kunstlicht in de kas opgekweekt en beoordeeld. De planten ontwikkelen zich in de kas op normale wijze tot graspol met alleen vegetatieve bladvorming.

### **Interactie van het GGO met het milieu en daarbij behorende risicoaspecten**

- hph: De aanwezigheid van het hyg (ofwel hph) gen zal naar het oordeel van de commissie niet leiden tot een selectief voordeel voor genetisch gemodificeerde *Lolium perenne* planten onder zowel natuurlijke als teeltomstandigheden. Zowel COGEM als RIKILT gaan bij de beoordeling van de veiligheid van het gebruik van antibioticum-resistentiegenen (inclusief hyg) 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 het antibioticum. 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. Frequenties van voorkomen van het hygromycine-resistentiegenen in het milieu zijn niet bekend. Echter, gezien de frequentie van reeds aanwezige hygromycine-resistentie in micro-organismen in de bodem of in de darmflora van mens en dier door de introductie van planten met hygromycine-resistentiegenen worden geen noemenswaardige effecten verwacht. Er is geen algemene klinische en veterinaire toepassing voor hygromycine, dit in verband met de toxiciteit van het antibioticum. In een gezamenlijk advies van COGEM en RIKILT wordt de Minister van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieu geadviseerd het gebruik van hyg ook in de toekomst toe te blijven staan (CGM/000918-01).

- *LQIMath*: Door het tot expressie brengen van het *LQIMath* gen wordt in genetisch gemodificeerde *Lolium*-planten de generatieve fase uitgesteld en wordt het langer en/of intensiever voortduren van de vegetatieve groeifase bewerkstelligd. De modificatie kan direct effect hebben op het vermogen tot verspreiden en overleven. Enerzijds kunnen de

gemodificeerde planten door het uitblijven van bloei een verhoogde vegetatieve fitness hebben gekregen, terwijl door het uitblijven van diezelfde bloei de plant niet meer in staat is zich generatief voort te planten. De gemodificeerde *Lolium*-planten hebben wellicht een verhoogde vegetatieve fitness doordat geen energie gestoken hoeft te worden in de vorming van reproductieve organen. Dit kan tevens invloed hebben op de levensduur van de planten die mogelijk door de modificatie verlengd wordt. Ten aanzien van het concurrentievermogen naar het nageslacht van de genetisch gemodificeerde *Lolium*-planten is die duidelijk verlaagd. Indien onder veldomstandigheden de planten uitsluitend vegetatief blijven zullen ze zich niet generatief kunnen voortplanten. In geval van slechts (sterk) uitgestelde bloei zou de eigenschap zich kunnen vestigen in wilde populatie.

## **Eerdere beoordelingen**

Handelingen met genetische gemodificeerde *Lolium*-planten zijn voor zover bekend nog niet eerder beoordeeld in Nederland of andere lidstaten van de Europese Gemeenschap. Ook zijn er nog niet eerder genetisch gemodificeerde planten met ingebrachte bloeivertraging beoordeeld voor introductie in het milieu. Voor het gebruik van het hyg 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 hyg gen zijn reeds veelvuldig geëvalueerd en toegestaan in het kader van nationale en internationale veldproef- en marktaanvragen.

## **Beschouwing en analyse**

### **Schaal van het experiment**

Het betreft hier een klasse 1 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 1 hectare bedraagt op maximaal 1 locatie. Eventuele effecten moeten hierbij beperkt blijven tot het proefobject, hetgeen inhoudt dat verspreiding van de ingebrachte genen buiten het proefobject moet worden voorkomen. De schaal waarop de werkzaamheden zullen worden uitgevoerd en het feit dat eventuele effecten beperkt moeten blijven tot het proefobject heeft als gevolg dat de eventuele aanwezigheid van het, in planten niet tot expressie komende, ampicilline-resistentie niet in beschouwing wordt genomen.

### **Lokatie specifieke aspecten**

*Lolium perenne* is een in Nederland zeer algemeen voorkomende plantensoort in zowel cultuurweiden en –grasvelden als daarbuiten. Bovendien zijn ook andere plantensoorten waarmee *Lolium perenne* kan kruisen ruim vertegenwoordigd in de Nederlandse flora. Derhalve zijn er in Nederland geen gebieden aan te wijzen waar de kans op uitkruising van de nieuw ingebrachte eigenschappen naar andere *Lolium*-planten of andere grassoorten groter dan wel kleiner is.

## Monitoring

De commissie stelt vast dat er binnen het geslacht *Lolium* een belangrijke landbouwgewassen zijn. Binnen *Lolium* zijn er echter ook moeilijk beheersbare onkruiden. De ingebrachte eigenschap van bloeivertraging kan gevolgen hebben voor de vegetatieve fitness van de planten. Er zijn geen gegevens of de genetisch gemodificeerde *Lolium*-planten als gevolg van expressie van het *LQ/Math* gen een verhoogde vegetatieve fitness hebben ontwikkeld. Als veiligheidsmarge moet daarom aangenomen worden dat dit wel het geval is. Het algemeen voorkomen van de uitgangsoort in Nederland samen met het beoogde effect van de genetische modificatie en de onduidelijkheid over eventuele neveneffecten geeft de noodzaak aan dat alle vormen van verspreiding dienen te worden voorkomen. Immers, ten gevolge van de verspreidings- en overlevingskarakteristieken van gras staat een eventuele beperkte verspreiding gelijk aan een permanente introductie in het milieu. Er kan een onderscheid gemaakt worden tussen verspreiding via uitkruising en vegetatieve verspreiding. Gezien het feit dat de zaden van *Lolium* na jaren in de bodem te hebben gezeten alsnog kunnen kiemen ligt het voor de hand om bij zaai de zaden eerst te laten kiemen onder ingeperkte condities in de kas en slechts de kiemplantjes uit te zetten op het proefveld. Verspreiding via uitkruising kan worden voorkomen door bloeistengels tijdig te verwijderen en te vernietigen indien bloeiinductie wordt waargenomen. Hiertoe zal frequent een monitoring moeten plaatsvinden. Mocht bloei doorzetten dan worden de planten afgedood en/of volledig verwijderd. Doordat met deze maatregelen er geen bloei optreedt zal er ook geen sprake zijn van zaadvorming. Maatregelen ter voorkoming van verspreiding via zaad, zoals bijvoorbeeld een vogelnet, zullen om die reden niet nodig zijn.

Vermenging van individuele planten kan voorkomen worden met een braakliggingsregime rondom de grasplanten. Een overeenkomstig braakliggingsregime rondom het proefobject kan gehanteerd worden als extra veiligheidsmarge ter voorkoming van vegetatieve verspreiding van *Lolium* planten. Een dergelijke zone zou tevens het proefobject nog beter fysiek scheiden van de omgeving.

## Afvalverwerking

Gemodificeerde *Lolium* planten die bloeineiging vertonen tijdens het experiment zullen worden afgedood en/of verwijderd. De op het veld achtergebleven planten worden uitgegraven of worden afgedood met een systemisch herbicide. Voor beide opties geldt wel dat de maatregelen aantoonbaar effectief moeten zijn. Na afloop van de veldproef zal het proefobject gecontroleerd moeten worden op opslag. Omdat de kans erg groot is dat niet-gemodificeerde *Lolium* zaden “inwaaien” zal het proefobject gedurende het hele daarop volgende bloeiseizoen braak gehouden moeten worden. Van kiemplanten moet bepaald worden of deze genetisch gemodificeerd zijn. Deze bepalingen geven inzicht in hoeverre de toegepaste maatregelen ter voorkoming van verspreiding afdoende zijn geweest. De kans dat er na afloop van het experiment nog genetisch gemodificeerde *Lolium* planten op het proefobject gevonden zullen worden wordt gering geacht. Echter,



pas wanneer blijkt dat in het groeiseizoen volgend na afloop van de veldproef er geen genetisch gemodificeerde *Lolium* planten aangetroffen worden, kan het proefobject worden vrijgegeven voor eventuele andere beplanting.

## **Vervoeding en consumptieproeven**

Er zal geen vervoeding of consumptieproeven van het materiaal plaatsvinden.

## **Aanvullende eisen**

Naar aanleiding van bovenstaande aspecten stelt de commissie een aantal bijzondere maatregelen voor om verspreiding van genetisch gemodificeerde *Lolium*-planten te voorkomen. De veldproef wordt uitgevoerd op één locatie van maximaal 0,1 hectare. Dit maakt dat de proef beheersbaar is. Verder mag er niet gezaaid worden in het veld, maar mogen slechts in de kas opgekweekte (kiem)planten uitgezet worden. Om vermenging van de afzonderlijke grasplanten te voorkomen worden ze geplant met een onderlinge afstand van 75 cm (hart/hart). Om de afzonderlijke grasplanten heen moet een braakliggende zone gehanteerd worden, waarin alle plantengroei verwijderd moet worden, geldend zowel tijdens en na afloop van het experiment. Een rand van 3 meter om het proefveld moet eveneens vrijgehouden worden van plantengroei. De bloeiwijzen van schietende grasplanten op het proefobject moeten worden verwijderd voor het stadium van open bloei. Het proefobject moet vanaf dat de eerste tekenen van bloeineiging zichtbaar zijn in de eerste planten minimaal 1 x per week geobserveerd worden. Buiten de bloeiperiode is de observatiefrequentie minimaal 1 x per twee weken. Het proefobject moet worden braakgelegd gedurende het jaar na afloop van de proef. Indien grasplanten verwijderd worden kan dat geschieden middels uitgraving. De commissie acht dat het meenemen van minstens 5 cm van de ondergrond onder de graspol afdoende is om zeker te stellen dat de gehele plant verwijderd wordt. Ook kunnen grasplanten afgedood worden met een systemisch herbicide. Door middel van monitoring worden planten die niet 100% afgedood zijn opgespoord en alsnog verwijderd. Van de planten, die in het jaar volgend op de veldproef op het proefobject en de zone van 3 meter eromheen opkomen, moet bepaald worden of ze genetisch gemodificeerd zijn. Deze analyse moet inzicht geven of de maatregelen ter afdoding voldoende zijn. Het proefobject moet gecontroleerd worden op opslag tot één jaar na het laatste jaar waarin genetisch gemodificeerde *Lolium* planten zijn aangetroffen. Nadere eisen moeten gesteld worden aan de omheining van het terrein om versleping door o.a. konijnen te voorkomen. Een biologisch of kunstmatig scherm om het proefobject, dat als fysieke barrière fungeert om eventuele verspreiding via windbestuiving in te perken, is naar mening van de commissie afdoende.

## **Conclusies en advies**

Het betreft hier een veldexperiment met *Lolium perenne* L. (Engels raaigras). De soort is meerjarig, en kan overleven en verspreiden door middel van pollen, zaden en het wortelstelsel. In de winter sterft de plant tot de grond af, en in het voorjaar groeit de plant

weer uit en komt vanaf juni tot aan de herfst tot bloei. Het geslacht *Lolium* is ecologisch en agronomisch gezien een belangrijk gewas en komt zeer algemeen voor in de Nederlandse flora. *Lolium* en verwanten kunnen onkruidachtig zijn of soms moeilijk beheersbaar door natuurlijke herbicidenresistenties.

De vectoren zijn voor een klasse 1 experiment voldoende gekarakteriseerd, alle elementen zijn beschreven en daarnaast zijn de vectorkaarten gegeven. Het ingebrachte *LQIMath* gen, dat resulteert in bloeivertraging, is echter nauwelijks functioneel gekarakteriseerd, waardoor niet duidelijk is of dit ingebrachte gen ook neveneffecten tot gevolg heeft. Het is denkbaar dat de modificatie leidt tot een verhoogde vegetatieve fitness. Doordat de fitnessverandering als gevolg van de genetische modificatie op dit moment niet voorspelbaar is, is een genetische isolatie gewenst. Naar oordeel van de commissie zijn daarom klasse 1 werkzaamheden op zijn plaats, waarbij eventuele effecten beperkt moeten blijven tot het proefobject. In de onderhavige aanvraag worden om die reden eventuele bloeiwijzen verwijderd voordat stuifmeelpollen vrij kunnen komen. Ook de maatregelen, zoals die gesteld zijn als aanvullende eisen, zijn afdoende om vegetatieve verspreiding van de genetisch gemodificeerde *Lolium*-planten te voorkomen. Met aanvullende eisen ten aanzien van de monitoring zal eventuele opslag afdoende opgespoord en verwijderd worden.

Indien de veldexperimenten opgeschaald worden tot klasse 3 of hoger, zullen eventuele effecten niet langer beperkt te blijven tot het proefobject. In dat geval dienen gegevens overlegd te worden waaruit duidelijk wordt welke effecten er worden waargenomen met een daarbij behorende risicoanalyse.

Gezien het mogelijk brede werkingsspectrum van het genproduct *LQIMath* moeten er gegevens aangeleverd worden omtrent de genexpressie onder variërende omstandigheden. Verder dienen gegevens aangeleverd te worden van een vergelijk tussen overlevings- en verspreidingskarakteristieken van *Lolium*-planten met ingebrachte bloeivertraging en niet-gemodificeerde planten. Gezien de grote kans op uitkruising zullen in dat geval ook gegevens overlegd moeten worden over de fitness van de kruisingproducten tussen het ggo en *Lolium perenne* rassen en andere soorten waarmee *Lolium perenne* kan uitkruisen.

Derhalve luidt het advies van de commissie dat er geen bezwaar is tegen uitvoering van het beschreven veldexperiment met genetisch gemodificeerde *Lolium perenne* planten onder voorwaarde dat het veldexperiment wordt uitgevoerd met inachtneming van de additionele voorschriften zoals die geformuleerd zijn in het bovenstaande onderdeel 'Aanvullende eisen'. Het betreft een toestemming voor klasse 1 werkzaamheden (op maximaal 1 locatie van maximaal 0,1 hectare per locatie). De veldproef wordt dan op een wijze uitgevoerd waarbij uitkruising en/of vegetatieve verspreiding van de nieuw ingebrachte eigenschappen in *Lolium perenne*, namelijk de hygromycine-resistentie en de ingebrachte bloeivertraging, voldoende kan worden voorkomen en die bovendien hanteerbaar is.

## Signalering

In het verleden heeft de COGEM meerdere malen geadviseerd over de toelaatbaarheid van antibioticum-resistentiegenen in genetisch gemodificeerde planten. Recent is een door de COGEM en het RIKILT gezamenlijk opgesteld advies uitgegaan (CGM/000918-

01). Hierin wordt gesteld dat bij kleinschalige toepassing van genetisch gemodificeerde gewassen, waarbij geen sprake is van structureel gebruik voor humane dan wel dierlijke consumptie, de eventuele impact van toepassing van het AmpR gen alleen al door de geringe kwantiteit van het te introduceren materiaal voldoende is ingeperkt. Ook indien de teelt van een genetisch gemodificeerd gewas meer dan 10 hectare bedraagt, is er naar oordeel van de COGEM geen wetenschappelijk bezwaar tegen de toepassing van het AmpR gen voor wat betreft teelt, incidentele consumptie en veevoedertoepassing. Wel heeft de COGEM gesignaleerd (CGM/000918-01) dat gezien de maatschappelijke discussie het wenselijk is dat AmpR verwijderd is in geval van grootschalige toepassing en markttoelating.

De COGEM heeft kennisgenomen van de Integrale Nota Biotechnologie (INB) dat niet in overeenstemming is met het bovenstaand genoemd advies. Echter, er zijn geen nieuwe wetenschappelijke inzichten bekend op basis waarvan de COGEM bovenstaand advies heroverweegt. De commissie is dan ook van oordeel dat de eventuele aanwezigheid van het AmpR gen in genetisch gemodificeerde *Lolium*-planten, mede door de schaal van de voorgenomen werkzaamheden, geen bezwaar vormt.