

Advies betreffende: **Kleinschalige teelt van bloeiend, genetisch gemodificeerd Brassica napus L. (koolzaad) resulterend in vetzuurverhoging in zaad**

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

COGEM kenmerk
CGM/010614-01

BGGO nummer
BGGO 01/06

Datum advies
13 juli 2001

Samenvatting

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

- *AccA* gen, coderend voor acetyl-CoA carboxylase, resulterend in een verhoogd vetzuurgehalte in zaden;
- *Hyg* (ofwel *hpt*), coderend voor hygromycine fosfotransferase, dat hygromycine resistentie verleent.

In de aangevraagde experimenten wordt middels veldtesten de agronomische relevantie geëvalueerd van genetisch gemodificeerde koolzaad met ingebrachte vetzuurverhoging in zaad. Het betreft hier een klasse 1 experiment waarbij de werkzaamheden zullen worden uitgevoerd op 1 locatie in de gemeente Reimerswaal van maximaal 0,1 hectare. De proef omvat ook afgeleide lijnen ontstaan na kruisingen met niet-gemodificeerde koolzaadlijnen. Er wordt geen vervoedering of consumptieproeven voorzien.

Brassica napus, ofwel koolzaad, wordt in Nederland aangetroffen als cultuurplant op en rond akkers en als (ver)wilde(rde) plant op ruderaal terreinen, zoals bijv. wegbermen. Daarbij komen in de Nederlandse flora diverse andere kruisbare verwanten voor waarmee de uitgangsoort kan uitkruisen.

Het *accA* gen codeert voor een acetyl-CoA carboxylase. Dit enzym katalyseert de eerste reactie in de vetzuursynthese. De activiteit van acetyl-CoA carboxylase is bepalend voor de snelheid van de vetzuursynthese. Om negatieve effecten te vermijden wordt het *accA* gen middels een zaadspecifieke promotor slechts in zaden tot expressie gebracht. Hierdoor zal in het transgene koolzaad alleen tijdens de zaadzetting en alleen in de plastiden van het opslagweefsel van zaad een verhoogde omzetting van acetyl-CoA plaatsvinden. Met de genetische modificatie wordt een hoger oliegehalte in zaden beoogd. Doordat het ingebrachte *accA* gen nog niet volledig functioneel is gekarakteriseerd dient verspreiding van de ingebrachte eigenschappen vooralsnog voorkomen te worden.

Als selectiemerker tijdens het plantentransformatieproces is het hygromycine-resistentiegen *hyg* gebruikt. Het gebruik van dit gen is tijdens eerdere (markt)aanvragen positief beoordeeld. Tevens bestaat de mogelijkheid dat in het genoom van de genetisch gemodificeerde koolzaadplanten eveneens is geïntegreerd het kanamycine-

resistentiegenen *nptIII*, waarvan de expressie wordt gereguleerd door bacteriële elementen. De commissie is dan ook van oordeel dat de eventuele aanwezigheid van de antibioticum-resistentiegenen, *hyg* en *nptIII*, in genetisch gemodificeerde *Brassica napus* planten, mede door de schaal van de voorgenomen werkzaamheden, geen bezwaar vormt. Wel signaleert de commissie dat bij een eventuele opschaling van de werkzaamheden, vanaf klasse 3 of hoger, de afwezigheid van *nptIII* sequenties moet worden aangetoond. Dit met het oog op het huidige beleid van de regering omtrent het gebruik van bepaalde antibioticum-resistentiegenen.

Derhalve luidt het advies van de commissie dat er geen bezwaar is tegen uitvoering van het beschreven veldexperiment met genetisch gemodificeerde *Brassica napus* 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 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 verspreiding van de nieuw ingebrachte eigenschappen in *Brassica napus*, namelijk de antibioticum-resistenties tegen hygromycine en kanamycine alsmede de ingebrachte vetzuurverhoging in zaden, voldoende kan worden voorkomen.

Doel van het onderzoek

Het doel van de aanvraag is het evalueren onder veldomstandigheden van *Brassica napus* planten genetisch gemodificeerd met het *accA* gen, resulterend in vetzuurverhoging in zaden. Het *accA* gen codeert voor acetyl-CoA carboxylase en katalyseert de eerste reactie in de vetzuursynthese waar het acetyl-CoA omzet in malonyl-CoA. De activiteit van acetyl-CoA carboxylase is bepalend voor de snelheid van de vetzuursynthese. Om negatieve effecten te vermijden in de vegetatieve fase is het *accA* gen voorzien van een zaadspecifieke promotor afkomstig van het napine gen. Hierdoor zal naar verwachting in het transgene koolzaad alleen tijdens de zaadzetting en alleen in de plastiden van het zaad een verhoogde omzetting van acetyl-CoA plaatsvinden. Met de genetische modificatie wordt een hoger oliegehalte in zaden beoogd. Naar aanleiding van resultaten van een vergelijkbare studie wordt een verhoging van circa 5% verwacht. De verwachte meeropbrengst van olie in de genetisch gemodificeerde planten ligt in de orde van grootte van de natuurlijk spreiding van oliegehaltes in koolzaad (39% tot 46%).

Voor de targetting van het acetyl-CoA carboxylase eiwit naar de plastiden is gebruikt gemaakt van een ongemuteerd en een gemuteerd targetting signaalpeptide. In deze proef zal ook de werking van dit gemuteerde targetting signaalpeptide ten opzichte van het ongemuteerde signaal peptide geëvalueerd worden.

Bij de aangevraagde veldexperimenten zullen tevens (terug-)kruisingsproducten van primaire genetisch gemodificeerde koolzaadplanten met niet-gemodificeerde koolzaadplanten worden geïntroduceerd.

Aspecten van het gewas

Koolzaad behoort tot de soort *Brassica napus* L. Deze soort vormt volgens de Botanical Files (Vries., de F.T., Meijden., van der R., Brandenburg., W.A, Gorteria, supplement 1. 1992) geen onderdeel van de Nederlandse flora. Koolzaad behoort tot het geslacht *Brassica* L., waartoe tevens o.a. kool (*Brassica oleracea* L.), raapzaad (*Brassica rapa* L.) en zwarte mosterd (*Brassica nigra* L.) behoren. Alleen raapzaad en zwarte mosterd worden beschouwd als onderdeel van de Nederlandse flora.

Brassica napus is vermoedelijk ontstaan als een gevolg van natuurlijke hybridisatie tussen *Brassica oleracea* en *Brassica rapa* L. maar wordt tevens vaak verwisseld met *Brassica rapa*.

Koolzaad wordt in Nederland aangetroffen als cultuurplant op en rond akkers en als (ver)wilde(rde) plant op ruderaal terreinen, zoals bijv. wegbermen. Dit ten gevolge van enerzijds het inzaaien langs wegbermen en het gebruik op voerakkers ten behoeve van het bijvoederen van wild en anderzijds als opslag uit gemorst zaad. Hoewel de zaden en de rozetten van *Brassica napus* L. de winter kunnen overleven zijn er, volgens de eerder genoemde Botanical Files, aanwijzingen dat *Brassica napus* L. zich niet kan vestigen op een locatie in Nederland.

Brassica napus wordt in Nederland geteeld als voedergewas (met name koolraap en bladkool) en voor de productie van honing en oliehoudende zaden (koolzaad). De olie verkregen uit de koolzaadzaden wordt afhankelijk van het gehalte aan natuurlijke toxinen gebruikt voor industriële doeleinden dan wel verwerkt tot producten voor humane en dierlijke consumptie. De verschillende teeltvormen worden daarnaast ook gebruikt als grondverbeteraar en groenbemester.

Brassica napus is een geel bloeiende kruisbloemige en kent de volgende structuren voor verspreiding en overleving: pollen, zaden en voor enkele varianten een bladrozet met een verdikte wortel. *Brassica napus* kent onder natuurlijke omstandigheden geen vegetatieve vermeerdering.

De verschillende teeltvormen van *Brassica napus* kennen daarbij zowel zomervarianten (éénjarig) als wintervarianten (tweejarig). Na het zaaien van winterkoolzaad ontstaan in het eerste groeiseizoen kleine bladrozetten, die als overwinteringsstructuur dienen. Deze rozetten stellen de planten in staat de winter te overleven en het jaar daarop uit te lopen. In vergelijking met de zomervarianten die in het voorjaar worden gezaaid wordt bij het gebruik van wintervarianten een voorsprong in de ontwikkeling verkregen, waardoor de telers meer zekerheid verkrijgen aangaande de opbrengst.

Afhankelijk van de teeltvorm zal de oogst plaatsvinden voor de bloei (koolraap) dan wel na de bloei en het afrijpen (koolzaad).

Pollenkorrels blijven enkele uren tot enkele dagen vitaal. De bestuiving van *Brassica napus* geschiedt met name via insecten, hoofdzakelijk door bijen. Daarbij is zowel sprake van kruisbevruchting als zelfbevruchting. In Nederland kan *Brassica napus* theoretisch zowel met de eigen soort als met wilde verwanten kruisen. In opdracht van de COGEM is een rapport opgesteld dat ingaat op de in Nederland voorkomende kruisbare verwanten van *Brassica napus* (Visser A.J.C. de, Brandenburg W.A., Lotz L.A.P.. Kruisbare verwanten van *Brassica napus* L. en methoden van vrijhouden van isolatiezones. AB-DLO, 1999). Hoewel het kruisen van *Brassica napus* met wilde verwanten dus zou kunnen optreden zijn er geen aanwijzingen dat onder natuurlijke condities dergelijke spontane hybridisatie voorkomt. De kans op verspreiding via uitkruising met wilde

verwanten wordt vooralsnog klein geacht en zal gewoonlijk niet leiden tot populaties die zich zelfstandig kunnen handhaven in Nederland.

Brassica napus is een allotetraploide soort die is afgeleid van een hybridisatie van *Brassica rapa* (met genoomsamenstelling AA) en *Brassica oleracea* (genoomsamenstelling CC). Hierdoor heeft *Brassica napus* de AACC genoomsamenstelling gekregen. Metz P.L.J., Jacobsen E. & Stiekema W.J. (Aspects of the biosafety of transgenic oilseed rape (*Brassica napus* L.). Acta Botanica Neerlandica 46(1), p. 51-67, 1997) rapporteerden dat genoverdracht van fosphinothricin-tolerante koolzaad naar *Brassica rapa* biologisch aanzienlijk ingeperkt kan worden door integratie van het transgen op één van de chromosomen van het C-genoom van koolzaad of door integratie in het chloroplastgenoom dat normaliter matернаal overerft.

Indien bij de teelt van koolzaad geen maatregelen worden genomen ter voorkoming van de verspreiding van pollen moet bij de beoordeling rekening worden gehouden met de eventuele vorming op de koolzaadplanten op belendende percelen van zaden die drager kunnen zijn van de middels genetische modificatie ingebrachte sequenties.

Zaden van *Brassica napus* kunnen in de bodem lang overleven. Eventuele opslagcontrole moet hierop worden afgestemd.

Voor de vermeerdering wordt gebruik gemaakt van zaaizaad dat onder vastgelegde en gecontroleerde voorwaarden wordt geproduceerd. Daarbij worden de isolatieafstanden gehanteerd overeenkomstig de voorschriften voortvloeiend uit de Zaaizaad en plantgoed wet. Isolatievoorwaarden die verplicht zijn voor zowel de traditionele landbouw als de biologische landbouw.

De isolatie-afstand tot andere kruisbloemigen die gebruikt worden voor de productie van zaaizaad, zoals de NAK die voor koolzaad(pre)basiszaad voorschrijft, bedraagt 200 meter. Voor niet-zaaizaadproducties wordt volstaan met een isolatie-afstand van 100 meter zoals die volgens de NAK voor de productie van gecertificeerd zaad geldt.

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 de over te dragen sequenties bevat binnen de T-DNA borders. De vector met daarop de over te brengen DNA sequenties kan intermediair of 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. Tegenwoordig, zo ook in de onderhavige aanvraag, worden echter in de regel binaire vectorsystemen gebruikt. 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 vectoren pVDH742 en pVDH859 zijn beide afgeleid van pBin19 en zijn daarmee eveneens binaire vectoren.

Naast een replicatiebegin *oriV* bevatten de gebruikte vectoren pVDH742 en pVDH859 buiten de T-borders het gen *nptIII* dat resistentie verleent tegen kanamycine. Deze resistentie wordt gebruikt ten behoeve van selectie en vermeerdering in bacteriën. Daar deze genen buiten de T-DNA borders liggen zullen ze niet vaak worden overdragen naar het genoom van de plantencel tijdens de genetische modificatie. Bovendien zullen deze genen alleen tot expressie komen in bacteriën en niet in plantencellen.

Beschrijving van de te introduceren genen

Voor de modificatie zijn de plasmiden pVDH742 en pVDH859 gebruikt. Beide plasmiden zijn nagenoeg gelijk en verschillen alleen in een puntmutatie in het vierde codon van het targetting-signaal. Binnen de T-DNA borders zijn de volgende genetische elementen gebruikt:

- een zaadspecifieke promoter (pNapin), afkomstig uit *Brassica napus* (koolzaad);
- een signaalsequentie voor targetting naar de plastiden, afkomstig van het gen voor de kleine sub-unit (SSU) van het ribulose bifosfaat carboxylase enzymcomplex uit *Solanum tuberosum* (aardappel). Plasmide pVDH859 is ongemuteerd, plasmide pVDH742 bevat een puntmutatie in het vierde codon;
- een acetyl-CoA carboxylase gen (*accA*), afkomstig uit de schimmel *Emericella nidulans*, dat codeert voor een eiwit dat een rol speelt bij de vetzuursynthese;
- een terminator (tCHS), afkomstig uit *Petunia x hybrida* (petunia);
- een constitutieve, niet-weefsel-specifieke promoter (p35S), afkomstig van bloemkoolmozaïekvirus;
- een hygromycine-resistentie gen (*hyg*, ofwel *hpt*), coderend voor hygromycine fosfotransferase afkomstig uit *Escherichia coli*;
- een terminator (tNOS) van het nopalinesynthase gen van Ti-plasmide uit *Agrobacterium tumefaciens*;
- een 'UTR', een niet-getransleerde sequentie zonder functie, afkomstig van een getrunceerde nos-terminator.

Het gen coderend voor acetyl-CoA carboxylase is in koolzaad ingebracht met als doel het oliegehalte in zaden te verhogen. Acetyl-CoA-carboxylase katalyseert de eerste reactie in de vetzuursynthese, namelijk de omzetting acetyl-CoA naar malonyl-CoA.

Uit de vergelijking van planten verkregen met het genconstruct met de gemuteerde SSU en het ongemuteerde SSU, komen resultaten voort aangaande de rol en de betekenis van genproduct-targetting voor deze toepassing van het *accA* gen.

Risicoaspecten van de methode van vervaardiging

Door *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 juist in omgekeerde oriëntatie worden aangetroffen. In ongeveer 30 procent van de gevallen 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 voeding worden eventuele risico's die deze chimaere genproducten met zich meebrengen niet in beschouwing genomen omdat er door de schaal van het experiment en de inperking tot het proefobject geen significante effecten te verwachten zijn.

De mogelijkheid bestaat dat tijdens de transformatieprocedure tevens delen van de 'backbone' van de gebruikte plasmiden zijn overgebracht. Hierdoor is het mogelijk dat bijvoorbeeld het *nptIII* gen in het genoom van de plantencellen is geïntegreerd. Echter het *nptIII* gen bevat uitsluitend prokaryote expressiesignalen, waardoor het kanamycine-resistentiegen naar verwachting alleen tot expressie komt in bacteriën en niet in planten.

Karakterisatie van het (potentieel) overgebrachte DNA

Van de vectoren, zoals die gebruikt zijn voor de genetische modificatie, zijn alle elementen beschreven en de vectorkaarten aangeleverd. Hiermee wordt voldaan aan de criteria voor de beschrijving van de constructen zoals die vereist zijn voor klasse 1 werkzaamheden, waarbij eventuele effecten beperkt blijven tot het proefobject (zie COGEM-advies CGM/990518-41). In het stadium van beproeving waarop deze aanvraag betrekking heeft, heeft nog geen nadere moleculaire karakterisering plaatsgevonden.

De expressie van het selectiemerkgen *hyg* wordt gestuurd door de constitutieve 35S-promoter waardoor het *hyg* gen in de hele plant tot expressie komt. De expressie van het *hyg*-gen bleek tijdens de weefselkweekfase hoog genoeg om selectie op hygromycinehoudende media mogelijk te maken. Planten hebben van nature geen activiteit die resistentie verleent tegen hygromycine.

Het agronomisch relevante gen (*accA*) is voorzien van een zaadspecifieke promotor en een sequentie dat targetting verzorgt naar de plastiden alwaar de enzymen voor de vetzuursynthese zijn gelokaliseerd. Net als de meeste levende organismen bezitten koolzaadplanten van nature een acetyl-CoA carboxylase activiteit.

Vanwege de gebruikte methode van genetische modificatie is het niet uit te sluiten dat tevens 'backbone' sequenties van de vectoren in het plantengenoom zijn geïntegreerd. De aanvrager heeft (nog) geen gegevens aangeleverd waaruit blijkt dat deze sequenties ook daadwerkelijk afwezig zijn in het plantengenoom. Daarom wordt er vanuit gegaan dat ze wel zijn geïntegreerd, totdat hun afwezigheid overtuigend is aangetoond.

Interactie gewas en construct/transgenen

Beschrijving van het GGO

Als gevolg van de modificatie zijn de genetisch gemodificeerde koolzaadplanten in vergelijking tot niet-gemodificeerde koolzaadplanten resistent tegen het antibioticum hygromycine en vertonen de planten een verhoogd oliegehalte in de zaden. De verhoging in oliegehalte zal naar verwachting van de aanvrager ongeveer 5% bedragen, hetgeen binnen de grenzen van de natuurlijke variatie van 39-46% zou vallen. De aanvrager heeft echter geen empirische gegevens aangeleverd omtrent het oliegehalte in zaden van de genetisch gemodificeerde koolzaadplanten die deel uitmaken van de onderhavige aanvraag. Tot dusverre zijn de gemodificeerde planten met inzet van extra kunstlicht in de kas opgekweekt en beoordeeld. Hierbij werden, behalve de beoogde effecten, geen nieuwe kenmerken geconstateerd door de aanvrager. De planten zijn noch in Nederland noch elders in het milieu geïntroduceerd.

Interactie van het GGO met het milieu en daarbij behorende risicoaspecten

AccA: Door het tot expressie brengen van het *accA* gen wordt in genetisch gemodificeerde koolzaadplanten in zaden een verhoogd vetzuurgehalte verkregen. Dit leidt tot een verhoogde olieproductie per zaadje. Tot op heden zijn er geen aanwijzingen gevonden dat een verhoogd gehalte aan vetzuren in zaden, als gevolg van natuurlijke variatie, kan leiden tot een fitness-verandering. Onbekend is of er studies bestaan die specifiek op dit onderdeel ingaan. Net als de meeste levende organismen bevatten koolzaadplanten van nature een acetyl-Co carboxylase activiteit. Door de genetische modificatie wordt dus geen nieuwe enzymactiviteit in koolzaadplanten ingebracht, maar wordt een bestaande activiteit vanwege de genetische modificatie verhoogd. Volgens de aanvrager zal het resulterende fenotype daarom slechts in geringe mate verschillen van het wild-type en andere gecultiveerde koolzaadrasen. Door de zaadspecifieke promotor zal het *accA* gen alleen in zaden tot expressie komen. Acetyl-CoA vormt een centrale metaboliet bij veel acetyleringsreacties waaronder die van de hele vetzuursynthese. De aanvrager draagt resultaten aan van een studie waarin een soortgelijk construct is gebruikt met als doel een verhoogde vertzuursynthese in zaden van koolzaad te verkrijgen. Hier werd eveneens de zaadspecifieke napine-promotor en een SSU-signaalsequentie gebruikt om een acetyl-CoA carboxylase gen uit *Arabidopsis* te sturen. Bij deze studie is niet specifiek gekeken naar een eventuele afwijkende morfologie van de planten of een veranderd kiemgedrag. Het betrof hier geen veldexperimenten (Roesler *et al.*, Plant Physiol. 113: 75-81, 1997).

- *hyg*: De aanwezigheid van het *hyg* (ofwel *hpt*) gen zal naar verwachting niet leiden tot een selectief voordeel voor genetisch gemodificeerde *Brassica napus* 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 enige potentiële 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. De 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. 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* als selectiemerker in genetisch gemodificeerde planten ook in de toekomst toe te blijven staan (CGM/000918-01).

- *NptIII*: De aanwezigheid van het *nptIII* gen zal naar verwachting niet leiden tot een selectief voordeel voor genetisch gemodificeerde *Brassica napus* planten onder zowel natuurlijke als teeltomstandigheden. Zoals al hierboven genoemd gaan bij de beoordeling van de veiligheid van antibioticum-resistentiegenen zowel de COGEM als RIKILT er vanuit dat het risico van deze genen gelegen is in het feit dat horizontale genoverdracht mogelijk is tussen planten en (pathogene) micro-organismen die daardoor mogelijk resistent kunnen worden tegen het antibioticum. De eerste vraag die tijdens de risicoanalyse opkomt is de vraag hoe groot de kans op de feitelijke genoverdracht daadwerkelijk is. Hierover zijn slechts beperkt experimentele gegevens beschikbaar, wel is duidelijk dat de mogelijkheid van overdracht bestaat maar dat de frequentie zeer laag zal zijn. Daarentegen zijn er meer gegevens bekend omtrent frequenties van het natuurlijk voorkomen van reeds aanwezige kanamycine-resistentie in micro-organismen in de bodem of in de darmflora van mens en dier. Deze frequentie is vele malen hoger vergeleken met die als gevolg van horizontale genoverdracht. Verwacht wordt daarom dat de frequentie van kanamycine-resistentie in micro-organismen langs deze weg niet noemenswaardig zal toenemen. In een gezamenlijk advies van COGEM en RIKILT wordt de Minister van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieu geadviseerd het gebruik van *nptIII* ook in de toekomst toe te blijven staan (CGM/000918-01).

Eerdere beoordelingen

Handelingen met genetisch gemodificeerde koolzaadplanten zijn reeds eerder geëvalueerd en toegestaan in het kader van markttoelatingen C/FR/95/05/01A, C/UK/94/M1-01 en C/UK/95/M5-01. Het *accA* genconstruct is nog niet eerder beoordeeld voor introductie in het milieu.

Voor het gebruik van het *hyg* gen is de algemene wetenschappelijke opvatting dat het *hyg* gen op verantwoorde wijze toegepast kan worden 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, resulterend in een positief advies, en toegestaan in het kader van nationale en internationale veldproef- en marktaanvragen.

In een gezamenlijk advies van de COGEM en het RIKILT (CGM/000918-01) heeft de commissie geen bezwaar tegen het gebruik in genetisch gemodificeerde planten van *nptIII* als bacteriële selectiemerker, voor wat betreft de toepassingen voor teelt en incidentele consumptie, maar uitgezonderd veevoeder-toepassing. Ditzelfde standpunt is naar voren gebracht in een gezamenlijk advies van de COGEM, het RIKILT en het RIVM dat specifiek is toegespitst op het gebruik van het *nptIII* gen als bacteriële selectiemerker in aardappel (CGM/000623-01).

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 een dergelijke proef 1 hectare bedraagt op maximaal 1 locatie. Eventuele effecten moeten hierbij beperkt blijven tot het proefobject, hetgeen ondermeer inhoudt dat verspreiding van de ingebrachte genen vanuit het proefobject moet worden voorkomen. De beschrijving van de gebruikte genetische elementen voldoet aan de criteria voor een klasse 1 experiment. De te introduceren genetisch gemodificeerde koolzaadplanten zijn niet moleculair gekarakteriseerd, wat ook niet vereist is voor klasse 1 werkzaamheden. Gezien de schaal van de werkzaamheden, waarbij geen sprake zal zijn van vervoeding of consumptieproeven, en het gegeven dat eventuele effecten beperkt moeten blijven tot het proefobject, bestaat er naar oordeel van de commissie geen bezwaar tegen de aanwezigheid van de antibioticum-resistentiegenen *hyg* en *nptIII* in genetisch gemodificeerde koolzaadplanten. Mogelijke effecten die een gevolg kunnen zijn van de genetische modificatie van koolzaadplanten met het *accA* gen worden wel beschouwd omdat de overlevingskarakteristieken van de zaden van deze planten zodanig veranderd kunnen zijn dat de (temporele) grenzen van het proefobject overschreden worden.

De beheersbaarheid van de verspreiding van GGP's wordt vergroot door het beperken van de omvang van de experimenten tot maximaal 0,1 hectare.

Locatie specifieke aspecten

Brassica napus wordt in heel Nederland aangetroffen op ruderaal plaatsen, op voedselrijke omgewerkte grond of in wegbermen. In Nederland kan *Brassica napus* zowel kruisen met de eigen soort als met wilde verwanten. Derhalve zijn er in Nederland geen gebieden aan te wijzen waar de kans op uitkruising van de nieuw ingebrachte eigenschappen naar andere *Brassica*-planten of andere plantensoorten groter dan wel kleiner is.

De aanvrager stelt voor een isolatie-afstand te hanteren zoals die geldt voor de productie van koolzaad(pre)basiszaad (200 meter). In overeenstemming met het rapport van de Visser et al. (Visser A.J.C. de, Brandenburg W.A., Lotz L.A.P. Kruisbare verwanten van *Brassica napus* L. en methoden van vrijhouden van isolatiezones. AB-DLO, 1999) kan naar oordeel van de commissie uitkruising in voldoende mate beperkt worden door rondom het proefobject een isolatieafstand van 400 aan te houden ten opzichte van andere verwanten waarmee *Brassica napus* kan uitkruisen. Indien binnen de straal van 400 meter wel bloeiende kruisbare verwanten aangetroffen worden, dienen de bloeiwijzen van de niet-genetisch gemodificeerde bloeiende kruisbare verwanten te worden verwijderd, voordat zaadzetting plaatsvindt.

Monitoring

De aanvrager stelt voor om tijdens de veldproeven de genetisch gemodificeerde koolzaadplanten te observeren middels visuele waarneming. Tijdens deze observatieronden kan ook monster-name en analyse van plantmateriaal plaatsvinden,

waaronder (zich vormende) zaden. Waarnemingen vinden in het groeiseizoen minimaal één maal per twee weken plaats. Bij winter-groeitypen worden gedurende de late herfst en winter (van november tot en met maart) minimaal één maal per maand waargenomen. Dit observatieschema zal worden gehanteerd vanaf het begin tot aan het einde van de proef. Indien experimenten met winter-groeitypes wordt uitgevoerd zal dit schema zich over twee kalenderjaren uitstrekken.

De experimenten zijn bedoeld plaats te vinden met bloeiende, volledig fertiele planten. Om toch eventuele effecten beperkt te houden tot het proefobject zal uitkruising met in de directe omgeving aanwezige kruisbare verwanten moeten worden voorkomen. Te meer omdat het momenteel nog niet duidelijk is of de genetische modificatie effecten heeft op de zaadoverleving. Derhalve dienen maatregelen voorgeschreven worden die zaden die in de bodem terechtkomen inactiveren ofwel dient de aanvrager uitvoerig te monitoren op opslag van genetisch gemodificeerde koolzaadplanten.

Een verhoogd oliegehalte in de zaden zou misschien effecten kunnen hebben op de periode waarover zaden van koolzaad levensvatbaar kunnen blijven in de bodem. De aanvrager stelt in de aanvullende informatie dat het oliegehalte in de zaden van de genetisch gemodificeerde koolzaadplanten waarschijnlijk niet of nauwelijks hoger zal zijn dan de oliegehalten zoals gevonden niet-gemodificeerde koolzaadplanten, namelijk 39 tot 46%. De aanvrager verwacht om deze reden geen afwijkend fenotype anders dan een verhoogd oliegehalte in zaden. Daarbij dient opgemerkt te worden dat door de aanvrager geen gegevens zijn aangeleverd of het oliegehalte in zaden van de onderhavige genetisch gemodificeerde koolzaadplanten binnen de natuurlijke spreiding valt. Om die reden zijn eventuele effecten op de overleving en kiemkracht van de zaden niet uit te sluiten.

De commissie signaleert dan ook als onzekerheid de mogelijkheid van een langere kiembaarheid van de zaden als gevolg van de genetische modificatie. Bij een eventuele aanvraag tot opschaling van de werkzaamheden zal de aanvrager gegevens aan moeten leveren die deze aspecten in beschouwing nemen. Er zullen gegevens aangeleverd moeten worden die aangeven dat er geen relatie bestaat tussen het verhoogd oliegehalte en eventuele gevolgen in fitness-effecten of kiembaarheid op de zaadbank. Dit houdt in dat er gemonitord moet worden op opslag voor een periode van 10 jaar en dat tevens rondom het proefobject gemonitord dient te worden op opslag in een zone van 10 meter rond het proefobject.

Afvalverwerking

De op het veld achtergebleven planten worden, met uitzondering van eventueel te nemen en te analyseren monsters, behandeld met een afdoende dosis van een geschikt onkruidbestrijdingsmiddel. De dode of afgedode planten worden ter plaatse ondergewerkt, bijvoorbeeld tijdens de daaropvolgende gangbare grondbewerkingen. Materiaal, afkomstig van monsters, zal na afloop van de analyses (afhankelijk van de aard en omvang van het materiaal) eveneens na afdoding in de bodem worden gewerkt, geautoclaveerd of als bedrijfsafval afgevoerd naar een vuilverbrandingsinstallatie.

Vervoeding en consumptieproeven

Er zal geen vervoeding van of consumptieproeven met het materiaal plaatsvinden.

Aanvullende eisen

De commissie stelt de volgende eisen voor als waarborg dat eventuele effecten als gevolg van de introductie in het milieu van bovengenoemde genetisch gemodificeerde koolzaadplanten beperkt zullen blijven tot het proefobject:

- Rondom het proefobject dient een isolatieafstand van 400 gehanteerd te worden ten opzichte van andere verwanten waarmee *Brassica napus* kan uitkruisen. Indien binnen de straal van 400 meter wel bloeiende kruisbare verwanten aangetroffen worden, dienen de bloeiwijzen van de niet-genetisch gemodificeerde bloeiende kruisbare verwanten te worden verwijderd, voordat zaadzetting plaatsvindt.
- De vergunninghouder zal het proefobject op opslag moeten monitoren voor een periode van 10 jaar. Tevens rondom het proefobject dient er gemonitord te worden op opslag in een zone van 10 meter rond het proefobject.

Conclusies en advies

Het betreft hier een veldexperiment met *Brassica napus* L. (koolzaad). Koolzaad wordt in Nederland aangetroffen als cultuurplant op en rond akkers en als (ver)wilde(rde) plant op ruderaal terreinen. Er zijn geen aanwijzingen dat *Brassica napus* L. zich kan handhaven in Nederland. Daarbij komen in de Nederlandse flora diverse andere kruisbare verwanten voor waarmee de uitgangsoort kan uitkruisen. Zaden van *Brassica napus* kunnen in de bodem lang overleven. Eventuele opslagcontrole moet hierop worden afgestemd.

De vectoren zijn voor een klasse 1 experiment voldoende gekarakteriseerd, alle elementen zijn beschreven en daarnaast zijn de vectorkaarten gegeven. Het ingebrachte *accA* gen, dat resulteert in een een vetzuurverhoging in zaden, is functioneel onvolledig gekarakteriseerd, waardoor het momenteel niet duidelijk is of dit ingebrachte gen ook neveneffecten tot gevolg heeft. Naar oordeel van de commissie zijn daarom klasse 1 werkzaamheden op zijn plaats, waarbij eventuele effecten beperkt moeten blijven tot het proefobject. Om dit te waarborgen worden aanvullende eisen gesteld ten aanzien van de te hanteren isolatieafstand en opslagmonitoring.

Indien de veldexperimenten opgeschaald worden tot klasse 3 of hoger, behoeven eventuele effecten niet langer meer beperkt te blijven tot het proefobject. In dat geval dienen gegevens overlegd te worden waaruit duidelijk wordt of de genetische modificatie effecten heeft op de zaadoverleving met een daarbij behorende risicoanalyse.

Derhalve luidt het advies van de commissie dat er geen bezwaar is tegen uitvoering van het beschreven veldexperiment met genetisch gemodificeerde *Brassica napus* 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 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 verspreiding van de nieuw ingebrachte eigenschappen in *Brassica napus*, namelijk de antibioticum-resistenties tegen hygromycine en kanamycine alsmede de ingebrachte vetzuurverhoging in zaden, voldoende kan worden voorkomen.

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 *nptIII* 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 *nptIII* 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 *nptIII* verwijderd is in geval werkzaamheden worden opgeschaald waarbij eventuele effecten niet meer beperkt behoeven te blijven tot het proefobject bij 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 *nptIII* gen in genetisch gemodificeerde *Brassica napus* planten, mede door de schaal van de voorgenomen werkzaamheden, geen bezwaar vormt.