

Advies betreffende: **Veldproef met bacterie-resistente aardappellijnen**

Kennisgever: **Plant Research International B.V**

COGEM kenmerk  
**CGM/020118-06**

BGGO nummer  
**BGGO 01/12**

Datum advies  
**18 januari 2002**

## **Samenvatting**

Het betreft hier een aanvraag van Plant Research International om vergunning voor kleinschalige werkzaamheden op een proefveld in de gemeente Emmeloord met *Solanum tuberosum* (aardappel) planten waarin combinaties van de volgende genen zijn ingebracht: nptII, lys, cec en att. NptII codeert voor kanamycine resistentie, lys voor T4 lysozym, cec voor cecropine B en att voor attacine. Lysozym, cecropine en attacine hebben alle een antimicrobiële werking. De verwachting is dat de genetisch gemodificeerde aardappelplanten in vergelijking tot niet-gemodificeerde aardappelplanten een verhoogde resistentie vertonen tegen bepaalde plant-pathogene bacteriën. Eerdere aanvragen voor kleinschalige veldexperimenten met aardappelplanten waarin cecropine B tot expressie wordt gebracht zijn positief beoordeeld (CGM/920114-02 en CGM/930204-29). Planten die T4-lysozym en attacine tot expressie brengen zijn niet eerder door de COGEM beoordeeld.

In de aangevraagde experimenten wordt door middel van veldtesten de resistentie getoetst van de genetisch gemodificeerde aardappelplanten tegen de plantpathogene bodembacterie *Ralstonia solani*, de veroorzaker van bruinrot.

De commissie is van mening dat mogelijke effecten op in de bodem aanwezige niet-doel bacteriën door het T4-lysozym, cecropine en attacine voldoende zijn ingeperkt doordat de eiwitten hoofzakelijk in de zone rondom de wortels en knollen van de aardappelplanten worden uitgescheiden en het een kleinschalige veldproef betreft. De veldproef wordt bovendien nog verder ingeperkt doordat, conform de aanvraag, de bloeiwijzen van de genetisch gemodificeerde planten verwijderd worden. Een tweede punt van overweging van de commissie is een mogelijke verandering van de toxische eigenschappen van de aardappel door de expressie van de eiwitten. Hierbij wordt aangegeven dat er geen redenen zijn om aan te nemen dat de genetische modificatie zou leiden tot een verandering in toxische eigenschappen door de expressie van de eiwitten in de aardappel. Daarnaast is de veldproef voldoende ingeperkt door de in de aanvraag beschreven maatregelen ter voorkoming van uitkruising. Consumptie van de genetisch gemodificeerde aardappelen is niet toegestaan.

Het betreft hier toestemming voor klasse 1 werkzaamheden. Het advies van de commissie luidt dat er geen bezwaar is tegen uitvoering van het beschreven veldexperiment met de beschreven genetisch gemodificeerde *Solanum tuberosum* planten. De commissie is van oordeel dat er geen additionele voorschriften nodig zijn, in

aanvulling op de door de aanvrager beschreven maatregelen, om verspreiding de onderhavige aardappelplanten zelf, of verspreiding van de ingebrachte eigenschappen naar andere aardappelplanten, te reduceren.

### **Doel van het onderzoek**

Het doel van het onderzoek is het evalueren onder veldomstandigheden van genetisch gemodificeerde *Solanum tuberosum* planten die de antibacteriele eiwitten T4-lysozym, cecropine of attacine tot expressie brengen. In de aangevraagde experimenten wordt door middel van veldtesten de resistentie getoetst van de genetisch gemodificeerde aardappelplanten tegen de plantpathogene bodembacterie *Ralstonia solani*, de veroorzaker van bruinrot. Daarnaast worden gedurende de proeven mogelijke effecten van de geproduceerde antibacteriële eiwitten op specifieke groepen van de bodemmicroflora onderzocht.

### **Aspecten van het gewas**

Aardappel, *Solanum tuberosum* L., 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. De aardappel behoort tot het genus *Solanum*, de nachtschadeachtigen, waartoe ook de tomaat behoort. De volgende *Solanum* soorten behoren tot de Nederlandse Flora: de zwarte nachtschade, (*Solanum nigrum* subsp. *nigrum* L.), de beklieerde nachtschade (*Solanum nigrum* subsp. *schultesii* L.), bitterzoet (*Solanum dulcamara* L.), glansbes nachtschade (*Solanum physalifolium* Rusby) en driebloemige nachtschade (*Solanum triflorum* Nutt). Deze soorten behoren allen tot de groep van *Etuberosa*, aardappel tot de *Tuberosa*.

Aardappel kent de volgende structuren voor verspreiding en overleving: pollen, zaden en knollen.

In haar natuurlijke ecosysteem en in de meeste ecosystemen waarin de aardappel als cultuurgewas wordt toegepast vindt vrijwel altijd knolvorming en in de meeste gevallen ook bloei plaats. De pollenkorrels van aardappel zijn relatief zwaar en deze worden verspreid via insecten, met name hommels. Zowel kruis- als zelfbevruchting komt voor bij aardappel al vindt er hoofdzakelijk zelfbestuiving plaats (80-100%). Windbestuiving speelt geen rol van betekenis. Uitkruising met in Nederland voorkomende wilde verwanten van de aardappel is niet mogelijk en is dan ook nog nooit waargenomen ondanks een voortdurende aandacht van alle in Nederland voorkomende plantensoorten door floristen/ecologen. Tot op heden zijn er in Europa nog geen levensvatbare hybriden gevonden in de natuurlijke systemen. (Botanical Files (de F.T., Meijden., van der R., Brandenburg., W.A, Gorteria, supplement 1. 1992). In Nederland kan wel uitkruising plaatsvinden met andere cultuuraardappelen. Derhalve kunnen de bij aardappelplanten ingebrachte genen via uitkruising alleen verspreid worden naar andere cultuuraardappelen.

Kruisbestuiving, en daarmee kruisbevruchting en zaadvorming, vindt slechts plaats over een afstand van slechts enkele meters. Zaden worden niet door vogels verspreid. De zaden die eventueel worden gevormd op de cultuuraardappelen worden niet gebruikt, omdat bij de vermeerdering gebruik wordt gemaakt van pootaardappelen in plaats van

zaden. Ook worden de eventuele zaden niet benut voor andere toepassingen. Het loof van de aardappelen, inclusief de bloeiwijzen, met eventuele zaden wordt gewoonlijk voor de oogst afgedood en wordt niet verder benut. Er is aangetoond dat op het perceel eventueel zaden kunnen achterblijven die levensvatbaar zijn. Op basis van de ervaringen met de gangbare praktijk wordt verwacht dat een deel van deze zaden in staat is om de winter te overleven en te kiemen.

De knollen worden gevormd aan onderaardse uitlopers (stolonen) van de aardappelplant. Bij het rooien van de aardappelen blijft over het algemeen een aantal knollen achter. Deze knollen zijn koude-gevoelig en overleven een strenge winter in Nederland gewoonlijk niet. Gedurende zachte winters zijn aardappelknollen in staat om in Nederland te overleven en in het opvolgende jaar uit te lopen.

Opslagplanten kunnen ontstaan uit levensvatbare knollen dan wel uit zaden die zijn achter gebleven op het perceel of in de directe omgeving. Aardappelopslag uit knollen is onderscheidbaar van opslag uit zaad. Aan opslag in zaad zitten cotylen, terwijl die niet zitten aan opslag uit knollen. Onder omstandigheden (bijvoorbeeld bij aardappelrassen die veel zaad zetten) is het merendeel van de opslagplanten afkomstig van opslagzaad. Opslagplanten worden met name aangetroffen na een zachte winter. Echter, in het kader van de verplichte bestrijding van de aardappelmoehheidsziekte, wordt eventuele aardappelopslag routinematig verwijderd van percelen waar aardappelteelt heeft plaatsgevonden. De praktijk laat zien dat de bestrijding van aardappelopslag doelmatig is.

Aardappel kan zich dus in Nederland niet handhaven. Verwildering, het proces waarbij zich vanuit cultuurpopulaties beklivende wilde populaties ontwikkelen, is in Nederland dan ook niet waargenomen bij aardappel.

In aardappel komen toxinen voor, glycoalkaloiden. Bij de beoordeling van aardappellijnen ten behoeve van een rastroelating wordt het gehalte aan glycoalkaloiden vergeleken met referentierassen. Daarbij wordt onderscheid gemaakt tussen consumptieaardappelen en fabrieksaardappelen die een hoger TGA gehalte mogen hebben. Alleen rassen die ten aanzien van het totaal glycoalkaloid (TGA) gehalte voldoen aan de criteria komen in aanmerking voor plaatsing op de rassenlijst en mogen overeenkomstig worden geteeld. De bestaande landbouwkundige praktijk beheerst daarmee eventuele toenames in het TGA gehalte in voldoende mate. Betreffende het mogelijke effect op het TGA gehalte door genetische modificatie, heeft de COGEM eerder in een algemeen advies (CGM/940322-11) geoordeeld dat uit resultaten binnen Nederland is gebleken dat er onder genetisch gemodificeerde aardappelen niet vaker een te hoog TGA gehalte voorkomt, in vergelijking met klassiek veredelde aardappelen. Daarom kan aangesloten worden bij de gewone handelwijze voor de veredeling van aardappelen.

## **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 gebruikt 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 die 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. Tegenwoordig, zo ook in de onderhavige aanvraag, worden in de regel binaire vectorsystemen gebruikt, waarvan pBin19 een bekend voorbeeld is. 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 gebruikte vector pMOG402 ter constructie van de aardappellijnen die cecropine of attacine tot expressie brengen, is afgeleid van pBin19 en is daarmee eveneens een binaire vector. Verder wordt gebruik gemaakt van de binaire vector pSR 8-30 ter constructie van de T4-lysozym-producerende lijnen.

Naast een replicatiebegin oriV bevat de pMOG402 buiten de T-DNA borders het gen nptIII dat resistentie verleent tegen kanamycine. De vector pSR 8-30 bevat buiten de T-DNA borders het bla gen dat codeert voor ampicilline resistentie. Deze resistenties wordt gebruikt ten behoeve van selectie en vermeerdering in bacteriën die het plasmide dragen. Daar deze genen buiten de T-DNA borders liggen zullen ze niet vaak worden meegenomen in het integratieproces waarbij het T-DNA in het genoom van de plantencel integreert. Bovendien zullen deze genen alleen tot expressie komen in bacteriën en niet in planten. De aanvrager heeft een methode aangeleverd waarin wordt aangegeven op welke wijze aardappelplanten worden gecontroleerd op de afwezigheid van de nptIII en bla sequenties, deze methode is deugdelijk. Er zullen alleen genetisch gemodificeerde aardappelplanten in het veld worden gebracht waarvan met deze methode is bepaald dat ze vrij zijn van nptIII en bla sequenties.

#### Beschrijving van de te introduceren genen

T4-lysozym producerende aardappellijnen.

Voor de modificatie van de T4-lysozym producerende aardappellijnen is het plasmide pSR 8-30 gebruikt. Binnen de T-DNA borders zijn de volgende genetische elementen gebruikt:

- een promotor (nopaline synthase promotor) voor het nptII gen, afkomstig uit *A. tumefaciens*;
- kanamycine resistentiegen (nptII) uit *Escherichia coli*, coderend voor neomycine fosfotransferase;
- een terminator (gen 4 terminator) van het nptII gen, afkomstig uit *A. tumefaciens*;
- een constitutieve, niet weefsel specifieke promotor (CMV 35S promotor), afkomstig van het bloemkoolmozaiekvirus;
- lys, T4-lysozym gen, afkomstig uit bacteriofaag T4;
- Signaalpeptide van  $\alpha$  amylase, afkomstig uit gerst;
- 2 kopieën van de 'scaffold attachment region' aan beide zijden van de T4- lysozym cassette, afkomstig uit tabak.

Cecropine- producerende aardappellijnen

Voor de modificatie van de cecropine-producerende aardappellijnen is het plasmide pMOPG402 Mas2C4-mas1C4 gebruikt. Binnen de T-DNA borders zijn de volgende genetische elementen gebruikt:

- een regio (3' NOS), afkomstig uit *A. tumefaciens*, niet functioneel;
- kanamycine resistentiegen (nptII) uit *Escherichia coli*, coderend voor neomycine fosfotransferase;

- een zwak constitutieve promoter (mas1), afkomstig uit *A. tumefaciens*;
- een wond- en auxine-geïnduceerde promoter (mas2), afkomstig uit *A. tumefaciens*;
- cec, synthetisch cecropine B gen, afkomstig uit de grote zijdemot, *Hyalophora cecropia*, gekoppeld aan een signaalpeptide van hordothionine, afkomstig uit gerst;
- een terminator (OCS 3') van de mas1 promoter, uit *A. tumefaciens*;
- een terminator (35S) van de mas2 promoter, uit het bloemkoolmozaiekvirus.

#### Cecropine- en attacine- producerende aardappellijnen

Voor de modificatie van de cecropine-producerende aardappellijnen is het plasmide pMOPG402 Mas2C4-mas1Att gebruikt. Binnen de T-DNA borders zijn de volgende genetische elementen gebruikt:

- een regio (3' NOS), afkomstig uit *A. tumefaciens*, niet functioneel;
- kanamycine resistentiegen (nptII) uit *Escherichia coli*, coderend voor neomycine phosphotransferase;
- een wond- en auxine-geïnduceerde promote (mas2), afkomstig uit *A. tumefaciens*;
- cec, synthetisch cecropine B gen, afkomstig uit de grote zijdemot, *Hyalophora cecropia*, gefuseerd aan een signaalpeptide van hordothionine, afkomstig uit gerst;
- een terminator (35S), afkomstig van het bloemkoolmozaiekvirus;
- een zwak constitutieve promoter (mas1), afkomstig uit *A. tumefaciens*;
- att, attacine E gen, afkomstig uit de grote zijdemot, *Hyalophora cecropia*, gefuseerd met een C-terminaal tetrapeptide;
- een terminator (OCS 3') terminator, uit *A. tumefaciens*.

#### Risicoaspecten van de methode van vervaardiging

Door *Agrobacterium tumefaciens* gemedieerde transformatie van een plantencel worden DNA sequenties gelegen binnen de T-DNA borders geïntegreerd in het genoom van de cel. Statistisch gezien, blijkt dat het DNA snel in de kern terecht komt en daar op een 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 naast andere sequenties van de vector. In ongeveer 30 procent van de gevallen blijkt het T-DNA op twee of meer 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 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 bijvoorbeeld mogelijk dat het nptIII gen of het bla gen in het genoom van de plantencellen is geïntegreerd. Omdat de aanvrager voorafgaand aan de veldexperimenten controleert op de afwezigheid van deze sequenties, wordt de mogelijke aanwezigheid van deze sequenties in de plant niet verder in de risico-analyse in beschouwing genomen.

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

Van de vector, zoals die gebruikt is voor de genetische modificatie, zijn alle elementen beschreven en is er een vectorkaart 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 proefneming waarop deze aanvraag betrekking heeft, heeft nog geen nadere moleculaire karakterisering van de inserts plaatsgevonden. In de risico-analyse wordt er daarom vanuitgegaan dat alle genen behalve waarvan de afwezigheid is bepaald, aanwezig zijn.

Het nptII gen komt in alle genetisch gemodificeerde aardappellijnen constitutief tot expressie, in alle plantendelen. De expressie van het nptII gen bleek tijdens de weefselkweekfase hoog genoeg om selectie op kanamycine-houdend media mogelijk te maken. Het lys gen is voorzien van een 35S promoter en een signaalsequentie die zorgt voor targetting van het T4-lysozym naar de extracellulaire ruimten van de plant. Het gen komt hierbij tot expressie in alle plantendelen. Het cec gen in de cecropine-producerende planten wordt gereguleerd door de zwak constitutieve mas1 promoter of de verwonding- en auxine-geïnduceerde mas2 promoter. In fusie met de mas2 promoter is aangetoond dat verwonding inderdaad leidt tot een verhoogde transcriptie van het cec gen. De zwak constitutieve mas1 promoter zal kunnen leiden tot een expressie van het cecropine in alle plantendelen. Door de aanwezigheid van het signaalpeptide gefuseerd aan het cec gen, wordt het cecropine door de plant getransporteerd naar de extracellulaire ruimten. In de lijnen waarbij een combinatie van de cec en att genen, beide gefuseerd aan een signaalpeptide, is ingebracht, blijkt het door het mas1 gereguleerde attacinegen nauwelijks tot expressie te komen in plantenweefsel.

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

### Beschrijving van het GGO

Als gevolg van de genetische modificatie produceren de genetisch gemodificeerde aardappelplanten in vergelijking tot niet-gemodificeerde aardappelplanten de antibacteriele eiwitten T4-lysozym, cecropine of attacine. Tevens zijn de planten resistent tegen het antibioticum kanamycine. Op deze punten wordt hieronder nader op ingegaan.

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

- Lys, cec, att Het gen dat codeert voor T4 lysozym is afkomstig van bacteriofaag T4. Het lysozym is een eiwit dat in staat is de membraan van bacteriën af te breken door specifieke bindingen in een component van de celwand te splitsen. Het eiwit is werkzaam tegen zowel Gram-positieve als Gram-negatieve bacteriën. Cecropine B en attacine zijn tevens eiwitten met een antimicrobiële werking en zijn afkomstig uit de grote zijdemot (*Hyalophora cecropia*). Cecropine B is een klein eiwit (35-37 aminozuren), terwijl attacine groter is (180-190 aminozuren). Beide eiwitten hebben een antibacteriële activiteit, doordat ze interfereren met de opbouw van de buitenmembraan van Gram-

negatieve bacteriën. De eiwitten zijn in de planten gekoppeld aan zogenaamde signaalpeptiden waardoor de gevormde eiwitten worden getransporteerd naar de extracellulaire ruimtes van de genetisch gemodificeerde aardappelplanten. Hierdoor worden de eiwitten door de planten uitgescheiden, zowel bovengronds als ondergronds. Bij eerdere risico-analyses is onder ogen gezien dat de uitscheiding van dergelijke eiwitten een mogelijk effect kan sorteren op in de bodem aanwezige niet-doel bacteriën. Dergelijke effecten zouden mogelijk kunnen leiden tot een verandering in de activiteit van belangrijke microbiële bodemfuncties waardoor deze functies verstoord kunnen raken. Van aardappellijnen die cecropine B tot expressie brengen, zijn in het kader van dossier BGGO 91/02 en 92/17 gegevens overgelegd. Uit proeven uitgevoerd ten behoeve van deze aanvragen is naar voren gekomen dat de genetisch gemodificeerde aardappelplanten die cecropine produceren geen effect hadden op het aantal kweekbare micro-organismen, en op de samenstelling van de kweekbare bodemmicroflora. Daarnaast is uit literatuuronderzoek bekend dat een genetisch gemodificeerde T4 lysozym-producerende aardappellijn een licht onderdrukkend effect van de Enterobacteriaceae op en rondom de wortels en knollen teweeg te brengt. Met moleculaire methoden werd echter geen effect op de totale microflora rondom de wortels en knollen van deze aardappellijn geconstateerd (Lottman et al., 2000, FEMS Microbiology Ecology 33: 41-49). Het is niet bekend wat het mogelijke effect op de bodemmicroflora is van planten die zowel cecropine als attacine tot expressie brengen. Hoewel attacinen minder actief zijn dan cecropinen, wordt er in de wetenschappelijke wereld van uitgegaan dat zij in synergie werken met cecropinen en daarmee de lytische activiteit verhogen ten opzichte van de werking van de twee eiwitten indien die afzonderlijk worden toegepast. Hierover zijn echter geen experimentele gegevens bekend. De commissie heeft hierbij in overweging genomen dat de veldproef in voldoende mate is ingeperkt doordat mogelijke effecten op de bodemmicroflora hoofdzakelijk beperkt zullen zijn tot de zone rondom de wortels en knollen van de aardappelplanten en het een kleinschalige veldproef betreft. De eventuele effecten op niet-doelbacteriën zijn daardoor beperkt tot de locatie waar de genetisch gemodificeerde planten worden geteeld. De veldproef wordt bovendien nog verder ingeperkt doordat, conform de aanvraag, de bloeiwijzen van de genetisch gemodificeerde planten verwijderd worden.

- Een tweede aspect dat kan worden beschouwd is de mogelijkheid dat de toxische en allergene eigenschappen van de aardappelplanten zijn veranderd door de genetische modificatie met de lys, cec of att genen. Dit met het oog op eventuele incidentele consumptie van de aardappelen. Het zou hierbij kunnen handelen om de mogelijke toxiciteit of allergeniteit van het T4-lysozym, het cecropine of attacine. De nieuwe eiwitten die tot expressie komen in de aangevraagde genetisch gemodificeerde planten geven door hun werkingsmechanisme echter geen redenen om aan te nemen dat zij de toxische of allergene eigenschappen van de aardappelen zouden veranderen. De commissie is hierbij van oordeel dat aangezien de onderhavige aanvraag kleinschalige werkzaamheden betreft waarbij, conform de aanvraag, de bloeiwijzen voorafgaand aan bloei verwijderd zullen worden, mogelijke uitkruising van de eigenschappen naar consumptieaardappelen in voldoende mate ingeperkt wordt. Consumptie van de genetisch gemodificeerde aardappelen is niet toegestaan.

- NptII De aanwezigheid van het nptII gen (coderend voor kanamycine resistentie) zal naar verwachting niet leiden tot een selectief voordeel voor genetisch gemodificeerde *Solanum tuberosum* 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 dit gen 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.

Uit bovenstaande overwegingen met betrekking tot de ingebrachte genen en de voorgestelde maatregelen door de aanvrager, concludeert de commissie dat er geen redenen zijn die zich verzetten tegen kleinschalige werkzaamheden met deze genetisch gemodificeerde aardappelplanten.

## **Eerdere beoordelingen**

Handelingen met genetisch gemodificeerde aardappelplanten die cecropine B tot expressie brengen zijn in een eerder stadium positief beoordeeld voor dossiernummers BGGO 91/02 (CGM/920114-02) en 92/17 (CGM/930204-29). Het betroffen hierbij kleinschalige veldexperimenten. Handelingen met planten gemodificeerd met het lys of att gen zijn niet eerder door de COGEM beoordeeld.

Voor het gebruik van het nptII is de algemene wetenschappelijke opvatting dat het nptII op verantwoorde wijze toegepast kunnen worden 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, resulterend in een positief advies, 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 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 aardappelplanten zijn niet moleculair gekarakteriseerd, wat ook niet vereist is voor klasse 1 werkzaamheden. Gezien de schaal van de aangevraagde werkzaamheden (0.12 hectare), waarbij geen sprake zal zijn van vervoedering 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 antimicrobiële genen *lys*, *cec* en *att* en het antibioticum-resistentiegen *nptII* in genetisch gemodificeerde aardappelplanten.

### Locatiespecifieke aspecten

Het introductiegebied van de onderhavige genetische gemodificeerde aardappelplanten zal gelijk zijn aan de regio's waar teelt van niet-gemodificeerde cultuuraardappelrassen plaatsvindt. Aardappelteelt vindt plaats door heel Nederland. Teelt van fabrieksaardappelen ten behoeve van de zetmeelproductie vindt met name plaats in de Groningen en Drenthe, terwijl consumptieaardappelen met name worden geteeld in Flevoland, Zeeland en Noord-Brabant. Uitkruising is derhalve mogelijk, maar is niet locatie specifiek. Aardappelplanten worden eveneens aangetroffen buiten akkerbouwpercelen, echter alleen langs randen van akkerbouwarealen, in bermen en op ruderaal terreinen. Derhalve zijn er in Nederland geen gebieden aan te wijzen waar de kans op uitkruising van de nieuw ingebrachte eigenschap groter dan wel kleiner is. In de gangbare teelt wordt uitkruising niet als een probleem ervaren aangezien aardappelplanten alleen uit pootgoed worden geteeld en niet uit zaad. Verder bedragen de afstanden waarover uitkruising kan worden aangetoond slechts enkele meters.

### Monitoring

In de aanvraag is aangegeven op welke wijze de genetisch gemodificeerde aardappelplanten onderscheidbaar zijn van niet-gemodificeerde planten. De proefvelden zullen gedurende het teeltseizoen (4 maanden) geobserveerd worden op de symptomen van bruinrot en op symptomen van andere relevante plantenziekten. Tevens worden op regelmatige tijdstippen gedurende het seizoen monsters genomen van de microflora in en rondom diverse delen van de planten. Deze monsters worden geanalyseerd met moleculaire en plaattechnieken om eventuele effecten op de bodemmicroflora te bestuderen. Daarnaast wordt door de aanvrager aangegeven dat tot voorbij de bloeitijd de bloeiwijzen worden verwijderd voor het stadium van de bloei. De aanvrager geeft aan dat het gebruikte proefveld tot 5 jaar na de introductie van de GGP's niet gebruikt zal worden voor de teelt van aardappelen.

### Afvalverwerking

Na afloop van de experimenten zal het overblijvende materiaal bestaan uit het na de oogst resterende dode loofmateriaal met eventuele knollen. De planten worden na afloop vernietigd en achtergebleven knolmateriaal wordt handmatig verwijderd. Het veld wordt daarna bespoten met Roundup om knolopslag te voorkomen. Al het plantafval zal worden verzameld en worden vernietigd door verbranding.

### Vervoeding en incidentele consumptie

Er zullen geen vervoeding of consumptie experimenten plaatsvinden.

## Aanvullende eisen

De ingebrachte genen zelf vormen geen aanleiding voor additionele maatregelen, in aanvulling op de door de aanvrager aangegeven maatregelen ter voorkoming van uitkruising.

## **Conclusies en advies**

Het betreft hier een veldexperiment met *Solanum tuberosum* (aardappel). Aardappel vormt geen onderdeel van de Nederlandse flora. Uitkruising naar wilde verwanten vindt niet plaats. Uitkruising naar andere cultuurrassen is wel mogelijk. Er wordt echter door de aanvrager aangegeven dat bloeiwijzen van de genetisch gemodificeerde planten verwijderd zullen worden. Hierdoor zal uitkruising geminimaliseerd worden. Aardappel wordt in Nederland vegetatief vermeerderd. Aardappelknollen zijn vorstgevoelig en kunnen alleen zachte winters overleven.

De vectoren zijn voor een klasse 1 experiment voldoende gekarakteriseerd, alle elementen zijn beschreven en daarnaast zijn de vectorkaarten gegeven. De aangebrachte modificaties door de *lys*, *cec* en *att* genen, die resulteren in een verhoging van resistentie tegen bepaalde plant-pathogene bacteriën in de aardappelplanten, zijn functioneel onvolledig gekarakteriseerd, waardoor het momenteel niet duidelijk is of de ingebrachte genen ook neveneffecten op de bodemmicroflora en op de toxiciteit van de knollen 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.

Al het bovenstaande in beschouwing genomen luidt het advies van de commissie dat er geen bezwaar is tegen uitvoering van het beschreven veldexperiment met de onderhavige genetisch gemodificeerde *Solanum tuberosum* planten. De commissie is tevens van oordeel dat er geen additionele voorschriften nodig zijn, anders dan door de aanvrager aangegeven, om verspreiding van de onderhavige aardappelplanten of de ingebrachte eigenschappen te reduceren. Het betreft hier toestemming voor klasse 1 werkzaamheden. Daarnaast vindt verdere inperking plaats doordat uitkruising naar andere planten in voldoende mate wordt voorkomen door het verwijderen van bloeiwijzen van de genetisch gemodificeerde planten voordat bloei optreedt.

## **Aspecten bij opschaling**

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 minimaal gegevens overlegd te worden waaruit duidelijk wordt of de genetische modificatie effecten heeft op specifieke groepen van de bodemmicroflora met een daarbij behorende risicoanalyse. Gegevens over mogelijke effecten op de bodemmicroflora van de genetisch gemodificeerde aardappelplanten zijn bij de onderhavige aanvraag niet vereist, aangezien mogelijke effecten beperkt blijven tot het proefobject, namelijk tot de zone rondom de wortels en knollen van de planten.