

Advies betreffende: **Toetsing van genetisch gemodificeerde niet-bloeiende appelbomen met verhoogde schimmelresistentie in het veld**

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

COGEM kenmerk  
**CGM/030127-05**

BGGO nummer  
**BGGO02/03**

Datum advies  
**27 januari 2003**

## **Inleiding**

De vergunningaanvraag betreft kleinschalige werkzaamheden met genetisch gemodificeerde appelbomen in de gemeente Wageningen. Appelbomen zijn gevoelig voor ziekteverwekkers zoals bepaalde soorten schimmels. In de appelbomen zal naast een selectiegen (*nptII*) en een merker (*gus*) een eiwit (hordothionine) tot expressie wordt gebracht dat in de donor (gerst) een rol speelt bij schimmelresistentie. De appelbomen zullen worden getest op resistentie tegen *Venturia inaequalis*, de veroorzaker van appelschurft, *Podosphaera leucotricha* (meeldauw) en *Nectria galligena*, de veroorzaker van vruchtboomkanker.

Het doel van de voorgenomen werkzaamheden is het testen van de effectiviteit van de door hordothionine opgewekte schimmelresistentie in appelbomen. Indien de effectiviteit voldoende is gebleken, kan volgens de aanvrager de toepassing van de genetisch gemodificeerde planten mogelijk leiden tot een verminderd gebruik van bestrijdingsmiddelen.

## **Eerder COGEM advies**

De COGEM heeft 21 juli 2000 (CGM/000721-03) geadviseerd over werkzaamheden met transgene, hordothionine-producerende appelbomen die (zoals ook in de huidige aanvraag) zijn geënt op een niet-gemodificeerde onderstam (BGGO 00/04). De werkzaamheden betroffen appelbomen die onder gecontroleerde omstandigheden tot bloei werden gebracht en waar vruchtvorming op zou treden. De COGEM heeft positief geadviseerd over deze aanvraag met dien verstande dat de verspreiding van zaden door vogels voorkomen dient te worden door het met gaas omgeven proefobject te overspannen met vogelnetten. Bij opschaling van de experimenten naar klasse 3 of hoger dienden de gegevens over effecten van hordothionine op de bodemmicroflora aangeleverd te worden. Deze aanvraag is echter op procedurele gronden afgewezen, namelijk het ontbreken van een specifieke locatieaanduiding. In tegenstelling tot BGGO 00/04, wordt in de huidige aangevraagde werkzaamheden de bloei van de appelbomen voorkomen.

## **Aspecten van het gewas**

Appel (*Malus pumila*) behoort tot de familie van de *Rosaceae* en wordt met name geteeld voor directe consumptie van de vrucht. Alle huidige cultivars zijn ontstaan uit de wilde appel, welke niet rauw eetbaar is. Door intensieve kruising gedurende enkele

eeuwen zijn de huidige appelcultivars ontstaan, waarvan er op dit moment ongeveer 200 verschillende bekend zijn.

Appelbomen worden in de praktijk vegetatief vermeerderd. Hierdoor wordt een stukje stengel op een onderstam geënt (in de winter) of wordt een oogje op een onderstam geoculeerd (in de zomer). Onder natuurlijke omstandigheden duurt het ongeveer 3 tot 5 jaar voordat er bloei en eventueel zaadzetting optreedt. Gewoonlijk worden vruchten 130 tot 160 dagen na start van de bloei geoogst.

Appels bestaan voor ongeveer 80% uit water en voor het resterende deel bijna geheel uit cellulose. De appels die door de jaren heen veredeld zijn voor directe consumptie bevatten daarnaast relatief veel suiker en vrij weinig beschermende tannine, die de appel een zure smaak geven. Hierdoor zijn de vruchten gevoeliger geworden voor ziekten en vraat door insecten en andere dieren. Ook na de oogst en tijdens het transport zijn de appels gevoelig voor ziekten en fysische beschadiging.

Appel kan kruisen met wilde appel en andere soorten uit het geslacht *Malus*, door kruisbestuiving welke met name via insecten (bijen) plaatsvindt. Dit kan leiden tot fertiele nakomelingen. In Nederland komen tientallen *Malus* soorten voor, die zowel geteeld worden voor de consumptie dan wel zijn aangeplant in parken en tuinen voor hun sierwaarde.

## **Moleculair biologische aspecten**

### *De ingebrachte genen en eigenschappen*

Voor het verkrijgen van appelbomen die het hordothioninen tot expressie brengen, zijn de planten genetisch gemodificeerd met behulp van een vector. Als basisvector wordt gebruik gemaakt van pMOG402, een afgeleide van pBIN19 en bevat derhalve *nptIII*. Op deze vector zijn de volgende complete genen gelegen:

- *hth*, coderend voor alpha-hordothionine (zaadeiwit);
- *gus*, coderend voor glucuronidase ( $\beta$ -glucuronidase activiteit);
- *nptII*, coderend voor neomycine fosfotransferase (kanamycineresistentie).

Deze genen liggen achter een in eukaryoten werkzame promotor. Op de vector is ook het selectiegen *nptIII* aanwezig. Dit gen ligt achter een prokaryote promotor. Alleen genen die gelegen zijn achter een in eukaryote werkzame promotor komen in de plant tot expressie. De genen die beoogd zijn om in de plant te brengen zijn het *hth* gen (schimmelresistentie), het *gus* gen (merkergen) en het *nptII* gen(selectiegen).

### *Beschrijving van de te introduceren genen*

### Verhoging van resistentie tegen plant-pathogene schimmels

De resistentie van appelbomen tegen plant-pathogene schimmels wordt verhoogd, door de bomen genetisch te modificeren met een gen dat codeert voor alpha-hordothionine, een laag moleculair zaadeiwit uit gerst met een schimmelwerend effect. Appelbomen produceren van nature geen alpha-thionine of andere thioninen met een overeenkomstige structuur en werking. De appelbomen die in het aangevraagde

veldexperiment gebruikt worden bestaan uit een niet-gemodificeerde onderstam, waarop het genetisch gemodificeerde, hordothionine producerende gedeelte is geënt. Hierdoor zal het hordothionine alleen in de bovenstam tot expressie komen.

De bloei van de transgene appelbomen wordt onderdrukt, zodat er geen appelvorming zal plaatsvinden en consumptie door mens en dier is uitgesloten. Het is niet duidelijk of het eiwit een effect kan hebben op insecten. Echter in het monitoringsplan dat is opgenomen in de aanvraag staat vermeld dat de aanvrager mogelijke effecten van thioninen op insecten binnen het proefobject in ogenschouw zal nemen. Gezien de beperkte omvang van het proefveld mag worden aangenomen dat mogelijke effecten op insecten beperkt blijven tot het proefobject.

Effecten op micro-organismen kunnen worden verwacht, gezien de anti-microbiële werking van het hordothionine. Met name micro-organismen in het bodemecosysteem zullen blootgesteld worden aan het eiwit door middel van lek uit afgevallen en rottende bladeren. Het is onbekend welke concentraties van hordothionine die door lek uit de bladeren in het bodemecosysteem kunnen ontstaan en wat de effecten zijn van dergelijke concentraties op het bodemecosysteem. De effecten van hordothioninen zullen mede afhankelijk zijn van de stabiliteit van het eiwit in de bodem. Op basis van de structuur van het eiwit geeft de aanvrager aan dat kan worden verwacht dat het eiwit na vrijkomen uit de plant, snel zal worden afgebroken door in de bodem aanwezige proteasen. De mogelijkheid dat het bodemecosysteem wordt blootgesteld aan hoge concentratie van het eiwit via lek of excretie via de wortels van bomen wordt niet waarschijnlijk geacht, aangezien de onderstam niet genetisch gemodificeerd is. Ook wordt het niet waarschijnlijk geacht dat grote hoeveelheden van het hordothionine getransporteerd wordt door het floeemsap, omdat de eiwitten niet over de celmembranen getransporteerd zullen worden. Gezien de onbekendheid van de concentraties van hordothioninen die eventueel in de bodem terecht zullen komen en de effecten bij dergelijke concentraties op het bodem ecosysteem dienen de effecten beperkt te worden tot het proefobject.

Bij opschaling van de experimenten tot klasse 3 of hoger worden gegevens gevraagd over effecten van hordothioninen op het bodemecosysteem in relatie tot het werkingsspectrum, expressieniveaus en de stabiliteit van het hordothioninen in de bodem. Daarnaast zullen monitoringsgegevens over de mogelijk effecten van genetisch gemodificeerde bomen op insecten van belang worden geacht.

### Merkergeren

In de genetische gemodificeerde appelbomen is het *gus* gen, afkomstig van de bacterie *Escherichia coli* en coderend voor het enzym  $\beta$ -glucuronidase, ingebracht.  $\beta$ -Glucuronidase wordt onder meer aangetroffen in verschillende zoogdieren, weekdieren, insecten, planten, schimmels en prokaryoten. Het is niet te verwachten dat de genetische gemodificeerde appelbomen ten gevolge van  $\beta$ -glucuronidase activiteit een selectief voordeel verkrijgen ten opzichte van de uitgangsbomen.

## Selectiegenen (antibioticumresistentiegenen *nptII* en *nptIII*)

Twee selectiegenen zijn er gebruikt tijdens de ontwikkeling van de genetisch gemodificeerde appelbomen, *nptII* en *nptIII*. De COGEM heeft reeds eerder positief geadviseerd (CGM/000918-01) over deze twee selectiegenen. Echter, in de Integrale Nota Biotechnologie, wordt geschreven dat voor teelt in het veld waarbij geen sprake is van een marktintroductie, uitsluitend toestemming wordt verleend indien is aangetoond dat in de planten geen andere antibioticumresistentiegenen zijn ingebracht dan de genen *nptII* en *hpt*. Uit de aanvraag blijkt dat op de vector die is gebruikt voor de genetische modificatie het antibioticumresistentiegen *nptIII* gelegen is. Er is een kleine kans dat het *nptIII* gen daadwerkelijk in planten terechtkomt en daarom is de aanvrager verplicht om gegevens te leveren waaruit de afwezigheid blijkt van het *nptIII* gen in alle genetisch gemodificeerde lijnen van appelbomen die in de veldproeven gebruikt gaan worden. De COGEM is van mening dat de aanvrager in voldoende mate (PCR en Southern blots) heeft bewezen dat *nptIII* niet meer aanwezig is in de appelbomen.

### **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. In de onderhavige aanvraag wordt verzocht om de werkzaamheden te mogen uitvoeren op 1 locatie met een totaal oppervlak van maximaal 0,25 hectare. Eventuele effecten moeten hierbij beperkt blijven tot het proefobject, hetgeen inhoudt dat verspreiding van de ingebrachte genen buiten het proefobject moet worden voorkomen.

### **Overwegingen en advies**

De COGEM adviseert positief over het afgeven van een beschikking voor de voorgenomen werkzaamheden met transgene appelbomen. Het betreft een kleinschalige proef en verspreiding in het milieu wordt voorkomen door de bomen niet in bloei te laten komen. Belangrijk is dat men heeft vastgesteld welke appelbomen lijnen ongewenste sequenties (*nptIII*) bevatten, van buiten het T-DNA insert-gebied en dat deze niet worden opgenomen in de veldproef.

### **Additionele overwegingen**

De COGEM acht het van belang op te merken dat de informatie van de aanvrager een aantal onjuiste aannames en in sommige gevallen onvolledige informatie bevat. Deze zijn voor de beoordeling van een kleinschalige veldproef zoals in de onderhavige aanvraag niet van belang, maar in geval van opschaling van de experimenten zal de aanvrager over de volgende punten om opheldering worden gevraagd:

- De aanvrager vermeldt dat hordothioninen niet toxisch zijn voor dieren, maar er wordt geen informatie aangeleverd waaruit blijkt dat dit het geval is. De COGEM zou dit standpunt graag onderbouwd zien.
- De aanvrager vermeldt dat appel zich moeilijk kan handhaven in Noordwest Europese landen zoals Nederland en dat de zaden waarschijnlijk de winter niet overleven, omdat ze stratificatie (minimaal 6-7 weken koude) nodig hebben om te kunnen kiemen. De

COGEM is van mening dat gezien het voorkomen van koude winters in Nederland niet ongebruikelijk is, de appelzaden wel een kans hebben om de winter te overleven en te kiemen.

### **Conclusies en Advies**

De COGEM heeft tegen de in de aanvraag beschreven werkzaamheden, onder de voorgestelde voorwaarden, geen bezwaar. Het betreft een toestemming voor klasse 1 werkzaamheden, op maximaal 1 locatie van maximaal 0,25 hectare per locatie. De bloei van de transgene appelbomen wordt onderdrukt, zodat er geen appelvorming zal plaatsvinden. Echter, bij een aanvraag voor eventuele opschaling van de werkzaamheden zullen er gegevens aangeleverd moeten worden over de effecten op het bodemecosysteem in relatie tot het werkingspectrum, expressieniveau en stabiliteit van het hordothionine in de bodem. Daarnaast zullen monitoringsgegevens over mogelijke effecten van de genetisch gemodificeerde bomen op insecten van belang worden geacht. De COGEM zou bij opschaling ook antwoord willen hebben op de additionele overwegingen.