

Advies betreffende: **Veldproef met genetisch gemodificeerde Cichorei met
additionele fructosyltransferase**

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

COGEM kenmerk
CGM/040107-01

BGGO nummer
BGGO 03/07

Datum advies
13 januari 2003

Inleiding

De vergunningaanvraag betreft kleinschalige werkzaamheden met genetisch gemodificeerde, niet bloeiende cichoreiplanten (*Cichorium intybus*) in de gemeente Wageningen. Deze cichoreiplanten brengen een extra gen tot expressie dat codeert voor het enzym sucrose fructosyltransferase (SST). Hiermee wordt beoogd de kwaliteit van inuline, een suiker behorende tot de fructaangroep (1), in de penwortels van deze planten te verhogen. Het doel van de proef is het testen van de capaciteit tot fructaanproductie van de genetisch gemodificeerde cichoreiplanten onder veldcondities en de effecten van lage temperaturen op de kwaliteit van de geproduceerde inuline.

De wortels van Cichorei worden gebruikt als koffiesubstituut en in toenemende mate voor industriële extractie van fructanen. Lange fructaanketens vinden een toepassing als voedingsadditief, terwijl kortere fructaanketens gebruikt worden als energiearme zoetstof (2). Cichorei wordt onder andere gekweekt voor de productie van inuline. De eerste stap in de inulineproductie wordt gekatalyseerd door SST (3,4), dat van nature door Cichorei geproduceerd wordt (5). Gedurende de groei van de penwortel neemt de natuurlijke SST activiteit echter af. Deze afname wordt deels verantwoordelijk geacht voor de afname in de mate van polymerisatie (vorming van lange ketens suikermoleculen) van inuline in de wortel (5). Een hoge polymerisatiegraad van inuline heeft de voorkeur van de industrie (2), omdat deze als vetvervanger en prebiotica (substraten die de groei van heilzame bacteriën in de darm stimuleren) gebruikt kan worden (6). Door de expressie van het extra SST gen wordt verwacht dat de natuurlijke afname van SST activiteit in Cichorei wordt gecompenseerd, waardoor de polymerisatiegraad van inuline gelijk blijft of zelfs zal toenemen.

Aspecten van het gewas

Cichorium intybus L. behoort tot de familie van de *Asteraceae* en meer specifiek tot het genus *Cichorium*. Cichorei is inheems in Nederland (7). Cichorei is onder meer bekend in de teeltvormen Cichorei, roodlof, groenlof en witlof. De verschillende teeltvormen van *Cichorium intybus* zijn gewoonlijk tweejarig. In het eerste jaar blijft de plant vegetatief en vormt een bladrozet en een penwortel. In het tweede jaar vindt bloei en zaadzetting plaats. Bij een gering aantal planten vindt bloei en zaadzetting al in het eerste jaar plaats. Meestal is men alleen geïnteresseerd in het vegetatieve product dat na één jaar geoogst kan worden: de krop (roodlof), de stronk (witlof) of de wortel (Cichorei). De volgende *Cichorium* soorten behoren tot de Nederlandse flora: Wilde cichorei (*Cichorium intybus*)

en Andijvie (*Cichorium endiva* L.). Andijvie komt niet oorspronkelijk in de Nederlandse flora voor, maar komt wel voor door verwildering van gecultiveerde Andijvie. Cichorei kan met beide soorten kruisen en is in staat om te verwilderen en te overleven in Nederland. De onderhavige aanvraag heeft betrekking op veldexperimenten met niet-bloeiende cichoreiplanten. De planten zullen door de aanvrager gecontroleerd worden op de vorming van bloeiwijzen. Bloeiende planten zullen worden verwijderd uit het proefveld.

C. intybus plant zich geslachtelijk voort en is in principe zelf-incompatibel. Kruisbestuiving treedt op door insectenbestuiving en vindt voor een groot gedeelte door honingbijen plaats. Windbestuiving treedt niet op. Warm en droog weer geeft een hogere pollenproductie. Bloei-inductie vindt plaats na een koude periode (5° C gedurende vier weken). *C. intybus* vormt pollen, zaden en wortelstokken als overlevings- en verspreidingsstructuren.

De zaden blijven na de bloei in de bloembodem vastzitten en kunnen zich niet over grote afstanden verspreiden. Zaden die in de bodem terechtkomen kunnen tot vijf jaar kiemkrachtig zijn. De kiemkracht van de zaden loopt terug onder invloed van temperatuur en vochtigheid.

De penwortels van Cichorei overleven geen temperaturen lager dan –5°C en sterven af in de winter. Opslag kan veroorzaakt worden wanneer wortels of delen van wortels, die diep ondergeploegd worden het volgende jaar terug naar boven worden gebracht. Dit heeft in de staande landbouwpraktijk tot nu toe niet geleid tot agronomische problemen.

Moleculair biologische aspecten

De ingebrachte genen en eigenschappen

De cichoreiplanten zijn genetisch gemodificeerd door middel van *Agrobacterium tumefaciens* transformatie. Hiervoor zijn binaire vectoren gebruikt op basis van pBIN19 plasmide, genaamd pSST331 en pA33236. Deze vectoren bevatten derhalve *nptIII*. De insertie bevat:

- Enh 35S *CaMV*: een promotor afkomstig uit het *bloemkoolmozaiekvirus*, met een verhoogde promotoractiviteit. Deze promotor zorgt voor constitutieve expressie van de sucrose fructosyltransferase genen(*sst103* en *a33*);
- *Pnos*, de nopaline promotor, afkomstig van *A. tumefaciens*;
- *AMV*; een translatie enhancer, afkomstig van het *alfalfamozaiekvirus*;
- *Sst103*, codeert voor sucrose:sucrose fructosyltransferase afkomstig uit *Helianthus tuberosus* (in pSST331);
- *A33*, codeert voor sucrose:sucrose fructosyltransferase afkomstig uit *Helianthus tuberosus* (in pA33236);
- *NptIII*, codeert voor neomycine fosfotransferase (kanamycine resistentie), afkomstig uit *E. coli*;
- *LacZ*, codeert voor beta galactosidase, afkomstig uit *E. coli*;
- *Tnos*, terminator van het nopalinesynthase gen van het Ti-plasmide uit *A. tumefaciens*.

Genen verantwoordelijk voor een veranderd fructaangehalte van de penwortels

Zetmeel en sucrose zijn de meest voorkomende en meest bekende koolhydraat-reservebron in hogere planten (5). Fructanen zijn minder bekend maar komen in 15% van alle bloeiende planten voor als koolhydraatreservebron (8). Fructanen zijn polymeren bestaande uit fructose. De beide ingebrachte genen *a33* en *sst103* zijn afkomstig uit aardpeer (*Helianthus tuberosus*) en coderen voor de enzymactiviteit sucrose:sucrose fructosyltransferase (SST, EC2.4.1.99). Dit enzym katalyseert de eerste reactie in de vorming van inuline, een type fructaan. Het enzym SST zorgt voor de kortste ketenvorm van inuline. Als gevolg van de enzymactiviteit van fructaan:fructaan fructosyltransferase (FFT) kunnen de inulineketens verder worden verlengd door het aankoppelen van nieuwe fructose residuen.

Het SST enzym is reeds van nature actief in Cichorei, maar de activiteit van het enzym neemt af gedurende de groei van de penwortel (5). Deze afname wordt deels verantwoordelijk geacht voor de afname in de mate van polymerisatie van inuline in de wortel. Een hoge polymerisatiegraad van inuline heeft de voorkeur van de industrie (2), omdat deze als vetvervanger en prebiotica gebruikt kan worden (6). Door de expressie van extra genen coderend voor SST wordt verwacht dat de natuurlijke afname van SST activiteit in Cichorei wordt gecompenseerd, waardoor de polymerisatiegraad van inuline gelijk blijft of zelfs zal toenemen. Het doel van de proef is het testen van de capaciteit tot fructaanproductie van de genetisch gemodificeerde Cichorei onder veldcondities en de effecten van lage temperatuur op de kwaliteit van de geproduceerde inuline.

Antibiotica-resistentiegenen

Het *nptII* gen codeert voor een aminoglycoside antibioticum modifierend enzym van het *aph(3')II* type. Expressie van het gen resulteert in resistentie tegen kanamycine. De vectoren die gebruikt zijn voor de genetische modificatie bevatten het antibioticum resistentiegen *nptIII*. Expressie van het gen resulteert in resistentie tegen onder meer amikacine, wat in de medische gezondheidszorg als tweede lijn antibioticum wordt gebruikt. Amikacine wordt in klinische toepassingen alleen onder medisch toezicht gebruikt, vanwege het snelle ontstaan van resistenties (CGM/980929-06). Het *nptIII* gen is geplaatst op de 'backbone' sequentie van de vector en wordt niet in het genoom van planten ingebouwd en komt niet tot expressie.

Overwegingen

Door de genetische modificatie hebben de cichoreiplanten waarschijnlijk een ophoping van inuline met een hogere polymerisatiegraad in de penwortels. Fructanen worden over het algemeen als koolhydraatreservebron in de ondergrondse overwinteringsorganen van de plant opgeslagen. De opslag van fructanen zou tevens een rol kunnen spelen als cryoprotector of osmoregulator (5). Dit zou mogelijk kunnen leiden tot een verandering in de droogte- of vorsttolerantie van de planten. De COGEM acht het risico voor mens en milieu van effecten door mogelijke veranderingen in de droogte- of vorsttolerantie verwaarloosbaar klein. Ten eerste komen de cichoreiplanten niet tot bloei, waarmee uitkruising wordt voorkomen. Ten tweede wordt opslag voorkomen door de wortels na

het experiment handmatig te verwijderen, waarna nog twee jaar wordt gecontroleerd op opslag. Daarbij heeft de aanvrager aangegeven te monitoren op mogelijke veranderingen van koudegevoeligheid.

Door de veranderde suikersamenstelling zouden de wortels van de cichoreiplanten mogelijk meer gevoelig worden voor vraat van kleine dieren. Zelfs indien vraat zou toenemen als gevolg van de genetische modificatie is de COGEM van mening dat dit geen schadelijk effect op het milieu oplevert. Er is geen schadelijk effect op kleine dieren te verwachten omdat fructanen van nature in vele plantensoorten, waaronder Cichorei, voorkomen. Daarnaast zullen de genetisch gemodificeerde planten door een eventueel verhoogde vraatgevoeligheid minder kans hebben om te overleven.

De genetisch gemodificeerde cichoreiplanten met een veranderde suikersamenstelling kunnen mogelijk een effect hebben op de bodemmicroflora door lek uit de wortels. Wortellexudaten fungeren als voedingsbron voor bodembacteriën en een verhoogd gehalte aan voedingsstoffen kan leiden tot een verhoogde activiteit van bodembacteriën (9). De aanwezigheid van organische componenten zoals suikers kan zowel de opname van DNA (transformatie) als de overdracht van DNA tussen bacteriën (conjugatie) verhogen (10). Hierbij dient aangetekend te worden dat de waargenomen frequentie van transformatie in niet-steriele grond zeer laag is en dat het optreden van transformatie afhankelijk is van de mate van homologie tussen de donorsequenties en de ontvangende bacteriële sequenties. In het onderhavige geval betreft het plantaardige DNA sequenties zonder noemenswaardige homologie met bacteriële sequenties. Hierdoor wordt de kans dat transformaties optreden zeer sterk beperkt. Verder dient opgemerkt te worden dat het opgenomen DNA alleen in de bodemflora aanwezig blijft indien de opgenomen sequenties een selectief voordeel bieden. Gezien de oorsprong van het materiaal en de aard van de ingebrachte transgene sequenties lijkt de kans hierop zeer klein. Gezien het bovenstaande acht de COGEM de kans op schadelijke effecten voor de bodemmicroflora door de veranderde suikersamenstelling van de cichoreiplanten verwaarloosbaar klein.

Antibiotica-resistentiegenen

Twee selectiegenen zijn er gebruikt tijdens de ontwikkeling van de genetisch gemodificeerde cichoreiplanten, *nptII* en *nptIII*. De COGEM heeft reeds eerder positief geadviseerd (CGM/000918-01) over deze twee selectiegenen. Echter, in de Integrale Nota Biotechnologie, wordt gesteld 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 vectoren die zijn gebruikt voor de genetische modificatie het antibioticumresistentiegen *nptIII* gelegen is. Het *nptIII* gen wordt echter niet in de plant ingebouwd en de aanvrager is verplicht om op de aanwezigheid van het *nptIII* gen te controleren alvorens de planten gebruikt worden in de veldproef.

Conclusie en advies

De COGEM heeft tegen de in de ontwerpbeschikking beschreven werkzaamheden, onder de voorgestelde voorwaarden, geen bezwaar en acht de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein. De COGEM komt tot deze conclusie op basis van de

volgende argumenten. Ondanks het feit dat Cichorei zich geslachtelijk voortplant vindt uitkruising niet plaats omdat de aanvraag uitsluitend niet-bloeiende cichoreiplanten betreft. Eventuele vroeg-bloeiers worden verwijderd uit het proefveld. Opslag wordt voorkomen door de wortels handmatig te verwijderen na het experiment. Daarnaast moet de aanvrager nog twee jaar na het experiment controleren op opslag. Er is geen schadelijk effect van de verhoogde inulineproductie, voor het milieu te verwachten omdat fructanen van nature in vele plantensoorten, waaronder Cichorei voorkomen. Voordat de planten worden toegelaten tot de veldproef worden ze getest op de afwezigheid van het *nptIII* gen.

Referenties

- (1) Schittenhelm, S (1996). Productivity of root chicory, Jerusalem artichoke and sugar beet. In Fuchs, A, Van Laere A, Eds. Proceedings of the Sixth Seminar on Inuline, January 22-23, Leuven, Belgium, pp 100-103.
- (2) Flamm G, Glinsmann W, Kritchevsky D, Prosky L, Roberfroid M (2001). Inuline and oligofructose as a dietary fiber: a review of the evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 41: 353-362
- (3) Koops AJ and Jonker HH (1996). Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* Colombia. II Purification of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase and reconstitution of fructan synthesis in vitro with purified of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase and of fructan: fructan 1-fructosyltransferase. *Plant Physiology* 110: 1167-1175.
- (4) Van der Meer IM, Koops AJ, Hakkert JC, Van Tunen AJ. (1998). Cloning of the fructan biosynthesis pathway of Jerusalem artichoke. *Plant Journal* 15: 489-500.
- (5) Van Laere A and Van den Ende W (2002). Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. *Plant Cell and Environment* 25: 803-813.
- (6) <http://www.inulinplaza.com/docs/prebiotic-ingredient.pdf>.
- (7) De Vries FT, Van der Meijden R, Brandenburg WA (1992). *Botanical Files, Gorteria supplement 1*.
- (8) Hendry G. (1993). Evolutionary origins and natural functions of fructans. A climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist* 123, 3-14.
- (9) Krafczyk G, Trollenier G, Beringer H (1984). Soluble root exudates of maize: influence of potassium supply and rhizosphere microorganism. *Soil Biology & Biochemistry* 16, 315-322.
- (10) Nielsen KM and Van Elsas JD (2001), Stimulatory effects of compounds present in the rhizosphere on natural transformation of *Acinetobacter* sp BD413 in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 33, 345-357.