



Commissie Genetische Modificatie

Voorzitter: prof.dr.ir. B.C.J. Zoeteman

Aan de Staatssecretaris van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening
en Milieubeheer
De heer drs. P.L.B.A. van Geel
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

Uw kenmerk
BGGO 03/10

Uw brief van
30 januari 2004

Kenmerk
CGM/040303-02

Datum
4 maart 2003

Onderwerp
Advies ontwerpbeschikking BGGO 03/10

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van de ontwerpbeschikkingen BGGO 03/10 en de vergunningaanvraag, getiteld 'Application for the release into the environment of potato event AM02-1003, AM02-1005, AM02-1012, AM02-1017 and AM99-1089', aangevraagd door BASF Plant Science GmbH te Ludwigshafen, Duitsland, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de milieurisico's van kleinschalige (klasse 3) veldproeven met genetisch gemodificeerde aardappelen (*Solanum tuberosum*) met een verlaagd amylosegehalte. Het doel van de experimenten is middels veldproeven de agronomische eigenschappen van de genetisch gemodificeerde aardappelplanten met een verlaagd amylosegehalte te evalueren. Tevens zal plantenmateriaal verzameld worden voor verdere analyse en zal vermeerdering van deze aardappelplanten plaatsvinden.

De COGEM is van mening dat aan alle criteria die gesteld worden aan een klasse 3 experiment wordt voldaan. Hiernaast kan de gemodificeerde aardappel niet uitkruisen naar wilde verwanten. De aardappel kan wel uitkruisen naar andere cultuurrassen, maar hierbij dient te worden opgemerkt dat aardappelen in Nederland vegetatief worden vermeerderd. De knollen zijn vorstgevoelig en zullen de Nederlandse winter gewoonlijk niet overleven. In de noodzaak om eventuele aardappelopslag te verwijderen wordt in het kader van de verplichte bestrijding van *Phytothra infestans* voorzien. Uit experimenten is gebleken dat een verlaagd amylosegehalte geen effect heeft op de vorstgevoeligheid van aardappelen.

De COGEM heeft derhalve tegen de in de aanvraag beschreven werkzaamheden, onder de voorgestelde voorwaarden, geen bezwaar en acht de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'B.C.J. Zoeteman', with a long horizontal stroke extending to the right.

Prof. dr. ir. B.C.J. Zoeteman

c.c. Dr. ir. B.P. Loos
Dr. I. van der Leij

Titel: Veldproef met genetisch gemodificeerde aardappelplanten met een verlaagd amylosegehalte en herbicidenresistentie

COGEM advies: CGM/040303-02

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de milieurisico's van kleinschalige veldproeven met genetisch gemodificeerde aardappelen (*Solanum tuberosum*) met een veranderd zetmeelgehalte. BASF Plant Science GmbH is voornemens aardappelplanten met een veranderd zetmeelgehalte te evalueren en heeft hiertoe drie verschillende aanvragen ingediend: BGGO 03/09, BGGO 03/10, BGGO 03/11. De COGEM zal over elk van de drie afgegeven ontwerpbeschikkingen afzonderlijk adviseren (CGM/040303-01, CGM/040303-02, CGM/040303-03).

Het doel van onderhavige experimenten is middels veldproeven de agronomische eigenschappen van de genetisch gemodificeerde aardappelplanten met een verlaagd amylosegehalte te evalueren. Tevens zal plantenmateriaal verzameld worden voor verdere analyse en zal vermeerdering van deze aardappelplanten plaatsvinden. De vergunningaanvraag betreft kleinschalige werkzaamheden in de gemeente Borger-Odoorn.

De aanvraag omvat aardappelen waarbij de vorming van amylose geremd wordt. Voldoende remming heeft tot gevolg dat de aardappelen minder dan 2% amylose bevatten. In aardappelen komen twee soorten zetmeel voor, amylopectine en amylose. Amylopectine heeft, in tegenstelling tot amylose een sterk vertakte structuur. Zuiver amylopectine wordt gebruikt bij specifieke technisch hoogwaardige toepassingen in onder andere de textiel- en papierindustrie. De aanvrager verwacht dat met behulp van de genetisch gemodificeerde aardappelen de amylopectinewinning voor hoogwaardige toepassingen vereenvoudigd zal worden wat leidt tot een verminderd verbruik van chemicaliën, water en energie.

Voorgaande COGEM adviezen

De COGEM heeft in het verleden positief geadviseerd over een vergunningaanvraag voor aardappelen met een verlaagd amylose gehalte (CGM/011029-01, CGM/030909-01). Het betrof hier tevens een klasse 3 veldexperiment.

Schaal van het experiment

Het betreft hier een klasse 3 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 vijf hectare bedraagt, verspreid over maximaal tien locaties. Eventuele effecten hoeven niet meer strikt beperkt te blijven tot het proefobject. Om die reden is bij de beoordeling rekening gehouden met de gevolgen van de expressie van de betreffende genen op basis van resultaten uit eerdere proeven met dezelfde of vergelijkbare planten.

Aspecten van het gewas

De aardappelplant (*Solanum tuberosum*) behoort tot de familie van de *Solanaceae* waartoe ook de tomaat, aubergine, tabak en peper behoren en is als landbouwgewas afkomstig uit Zuid-Amerika (1). *S. tuberosum* is onderverdeeld in twee ondersoorten: *tuberosum* en *andigena*. De ondersoort *tuberosum* wordt in Europa geteeld. In onderhavige experimenten is gebruik gemaakt van de zetmeelrassen Seresta en Kuras als uitgangsrassen.

De COGEM beschrijft in haar advies van 29 oktober 2001 (CGM/011029-01) uitgebreid de risico-aspecten van het gewas aardappel. In dit advies wordt aandacht besteed aan de structuren die de aardappel kent voor verspreiding en overleving: pollen, zaden en knollen. De COGEM concludeerde destijds en is nog steeds van mening dat risico's van verspreiding en overleving van de aardappelplant verwaarloosbaar klein zijn. De aardappel komt in de Nederlandse flora niet voor, wel heeft zij wilde verwanten: de zwarte nachtschade, (*Solanum nigrum* subsp. *nigrum*), de beklierde nachtschade (*Solanum nigrum* subsp. *schultesii*), bitterzoet (*Solanum dulcamara*), glansbes nachtschade (*Solanum physalifolium*) en driebloemige nachtschade (*Solanum triflorum*) (2). Uitkruising naar deze verwanten is niet mogelijk (3). Uitkruising naar andere gecultiveerde aardappelrassen is wel mogelijk (3). Hierbij dient te worden opgemerkt dat de aardappel in Nederland vegetatief wordt vermeerderd. De knollen zijn koude-gevoelig en overleven de winter in Nederland gewoonlijk niet. Alleen tijdens zachte winters zijn deze aardappelknollen in staat te overleven en het volgende jaar uit te lopen (3). Echter in het kader van de verplichte bestrijding van *Phytophthora infestans* wordt eventuele aardappelopslag verwijderd (8). Verwildering van de aardappelplant is in Nederland nog nooit waargenomen. De COGEM merkt daarnaast op dat in het kader van de verplichte wisselteelt in Nederland zetmeelaardappelen slechts eens in de twee jaar op hetzelfde perceel geteeld mogen worden. De onwaarschijnlijke combinatie van twee zachte winters met een onvolledige verwijdering van aardappelopslag zou kunnen leiden tot incidentele opslag van een kruisingsproduct van de genetisch gemodificeerde aardappel en een

gecultiveerd aardappelras. Zoals eerder opgemerkt is verwildering van de aardappelplant in Nederland nog nooit waargenomen. Bovendien is verdere vestiging van dit kruisingsproduct niet mogelijk aangezien in de aardappelteelt gebruik gemaakt wordt van gecertificeerd pootgoed. De scherpe selectieve wijze van vermeerdering van dit pootgoed sluit uit dat zich hierin kruisingsproducten van onderhavige aardappelplant bevinden. Hiermee is in het geval van incidentele opslag nog een extra veiligheidsbarrière ingebouwd.

De aanvrager heeft in 1995 in Zweden veldproeven met soortgelijke aardappelplanten uitgevoerd. Hierbij zijn geen verschillen geconstateerd in vorsttolerantie. Ook experimenten uitgevoerd in het laboratorium hebben geen verschillen in vorsttolerantie aangetoond.

Tevens heeft de COGEM eerder positief geadviseerd over aardappelen met een verlaagd amylosegehalte (CGM/950203-07). In het advies stelt de COGEM dat er geen aanwijzingen zijn dat een verlaging van de hoeveelheid amylose een ongewenste invloed zal hebben op de vorstgevoeligheid van aardappelknollen. Dit heeft zij tevens herhaald in later uitgebrachte adviezen (CGM/990112-01, CGM/011029-01, CGM/030909-01).

Moleculair-biologische aspecten

Beschrijving van de geïntroduceerde genen

De genetisch gemodificeerde aardappellijnen AM02-1003, AM01-1005, AM02-1012, AM02-1017 zijn gegenereerd door middel van *Agrobacterium* transformaties. Als basisplasmide is gebruik gemaakt van het plasmide pAP2, welke afgeleid is van pZPZ200.

De pAP2 vector bevat naast de pZPZ200 sequenties de volgende elementen:

- Pgbss, knolspecifieke promotor van het *kzg* gen, afkomstig van *Solanum tuberosum*
- *kzg* gen, in antisense oriëntatie afkomstig van *S. tuberosum*
- Tnos, terminator van het nopaline synthase gen (*nospA*), afkomstig van *Agrobacterium tumefaciens*
- Pnos, constitutieve promotor, afkomstig van *A. tumefaciens*
- *ahas* gen, coderend voor acetoxyzuur synthase, afkomstig van *Arabidopsis thaliana*
- OCS, terminator van het octopine synthase gen afkomstig van *A. tumefaciens*

De genetisch gemodificeerde aardappellijn AM99-1089 is tevens gegenereerd door middel van een *Agrobacterium* transformatie. Hierbij is als basisvector gebruik gemaakt van het plasmide pHAXwO, welke afgeleid is van vector pGPTV-KAN.

De pHaxwO vector bevat naast de pGTV-KAN sequenties de volgende elementen:

- Pnos, constitutieve promotor, afkomstig van *Agrobacterium tumefaciens*
- *nptIII* gen, coderend voor neomycine fosfotransferase II, afkomstig van transposon Tn5
- *g7*, terminator van *A. tumefaciens*
- Pgbss, knolspecifieke promotor van het *kzg* gen, afkomstig van *Solanum tuberosum*
- *kzg* cDNA in antisense oriëntatie afkomstig van *S. tuberosum*
- Tnos, terminator van het nopaline synthase gen (*nospA*), afkomstig van *A. tumefaciens*

Eigenschappen van de geïntroduceerde genen

Het *kzg* gen codeert voor korrelgebonden zetmeelsynthase (KGZ) wat betrokken is bij de synthese van amylose. Het *kzg* gen is van nature al aanwezig in de aardappelplant. Door het inbrengen van een synthetisch *kzg* gen in ‘antisense’ oriëntatie wordt er ‘antisense’ boodschapper RNA gevormd. Hierbij worden secundaire RNA-structuren gevormd. Als gevolg van de vorming van deze secundaire structuren zijn de transcripten gevoeliger voor intracellulaire degradatieprocessen. Deze processen worden verondersteld de basis te zijn voor het opgewekte ‘antisense’ effect en daardoor voor de remming van amylosevorming in onderhavige aardappelplanten (4,5,6). Bij voldoende remming zullen de aardappelknollen minder dan 2% amylose bevatten.

De events AM02-1003, AM02-1005, AM02-1012, AM02-1017 bevatten tevens een gemuteerd *ahas* gen dat codeert voor acetoxyzuur synthase. Het enzym katalyseert de eerste syntheses stap van de aminozuren valine, leucine en isoleucine. De werking van een aantal herbiciden is gebaseerd op verstoring van dit enzym met het gevolg dat de vorming van deze aminozuren verhinderd wordt en de plant zal afsterven. Mutaties in het *ahas* gen kunnen resulteren in een verhoogde tolerantie voor deze herbiciden omdat de affiniteit tussen enzym en herbicide hierdoor verlaagd wordt.

Het *ahas* gen uit onderhavige aanvraag heeft een S653N mutatie ondergaan waardoor tolerantie voor het herbicide Imazamox is verkregen (7). Deze verworven resistentie is gebruikt als selectiesysteem voor de aardappeltransformaties. De COGEM merkt hierbij op dat deze herbicidenresistentie niet van agronomische betekenis is omdat de toepassing van Imazamox in Nederland verboden is.

De vector (pAP2) die gebruikt is voor de genetische modificatie bevat tevens het antibioticumresistentiegen *aadA*. Dit gen wordt gebruikt als selectiemarker bij transformatie-experimenten. Expressie van het gen resulteert in resistentie tegen spectinomycine. Het *aadA* gen is geplaatst op de ‘backbone’ sequentie van de vector. De COGEM merkt op dat de aanvrager onvoldoende gegevens levert waaruit blijkt dat de *aadA* sequenties afwezig zijn in de transgene plant. Bij een klasse 3

veldexperiment is dit niet vereist maar bij opschaling naar een klasse 5 experiment zal de aanvrager deze gegevens wel moeten aandragen.

Aardappellijn AM99-1089 die gebruikt wordt als vergelijkingsmateriaal, bevat het *nptII* gen dat als selectiemarker dient.

De vector (pHAXwO) die gebruikt is voor de genetische modificatie bevat tevens het antibioticumresistentiegen *nptIII*. Dit gen wordt gebruikt als selectiemarker bij transformatie-experimenten. Expressie van het gen resulteert in resistentie tegen amikacine, kanamycine en neomycine. Het *nptIII* gen is geplaatst op de 'backbone' sequentie van de vector. De aanvrager stelt dat het gen niet aanwezig is in de transgene plant maar de resultaten van het experiment die dit moet bewijzen zijn niet aangeleverd. Voor klasse 3 veldexperimenten is deze informatie wederom niet vereist maar bij opschaling naar een klasse 5 experiment zal de aanvrager deze gegevens wel moeten leveren.

Conclusies en Advies

De gemodificeerde aardappel kan in Nederland niet uitkruisen naar wilde verwanten. De aardappel kan wel uitkruisen naar andere cultuurrassen, maar hierbij dient te worden opgemerkt dat aardappels in Nederland vegetatief worden vermeerderd. De knollen zijn vorstgevoelig en zullen de Nederlandse winter gewoonlijk niet overleven. Uit experimenten is tevens gebleken dat een verlaagd amylosegehalte geen effect heeft op de vorstgevoeligheid van de aardappelen. Alleen tijdens zachte winters zijn de aardappelknollen in staat te overleven en het volgende jaar uit te lopen. In het kader van de verplichte bestrijding van *Phytophthora infestans* wordt eventuele aardappelopslag echter verwijderd

De vector is voor een klasse 3 experiment voldoende gekarakteriseerd. Er is een kaart van het construct aangeleverd waaruit blijkt welke combinaties van tot expressie te brengen sequenties, regulatie sequenties en overige selectie elementen zijn gebruikt voor de modificatie.

De COGEM heeft tegen de in de aanvraag beschreven werkzaamheden, onder de voorgestelde voorwaarden, geen bezwaar en acht de risico's van deze veldproef voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Referenties

- (1) T.B. Tutin, N.A. Burges, A.O. Chater, J.R. Edmondson, V.H. Heywood, D.M. Moore, D.H. Valentine, S.M. Walters, and D.A. Webb (1972). *Flora Europaea: Diapensiaceae to Myoporaceae*. Cambridge University Press, Cambridge
- (2) Van der Meijden, R (1996). *Heukels' flora van Nederland*, 22^e druk, Wolters-Noordhof, Groningen
- (3) Consensus Document on the Biology of *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* (Potato) No. 8, 1997
- (4) Yu, H, Kumar PP. (2003). Post-transcriptional gene silencing in plants by RNA. *Plant Cell Reports* (**22**): 167-174
- (5) Wassenegger M. and Pélissier T. (1998). A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. *Plant Molecular Biology* (**37**): 349-362.
- (6) Matzke M, Matzke, AJM and Kooter JM (2001). RNA: Guiding gene silencing. *Science* (**293**): 1080-1083
- (7) Andersson, M, Trifonova, A, Andersson, A.B., Johansson, M, Bülow, L, Hofvander, P (2003). A novel selection system for potato transformation using a mutated AHAS gene. *Plant Cell Rep* (**22**): 261-267
- (8) Hoofdproductschap Akkerbouw. Verordening HPA bestrijding *Phytophthora infestans* bij aardappelen 2003