



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  
C/SE/96/3501.02

Uw brief van  
7 mei 2004

Kenmerk  
CGM/040610-01

Datum  
10 juni 2004

Onderwerp  
Advies martkaanvraag C/SE/96/3501

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van het dossier C/SE/96/3501, getiteld 'Application for the release into the environment of potato event EH92-527-1 according to the Genetically Modified Organisms Decree', aangevraagd door BASF Plant Science GmbH te Ludwigshafen, Duitsland, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de teelt, import en verwerking van een genetisch gemodificeerde zetmeelaardappel. De knollen van onderhavige aardappellijn bezitten een verlaagd amylosegehalte waardoor de opwerking tot hoogwaardig aardappelzetmeel (amylopectine) vereenvoudigd zal worden.

De COGEM is van mening dat de aardappellijn in voldoende mate gekarakteriseerd en de veiligheid voldoende onderbouwd is. Er vindt geen vorming van chimere eiwitten plaats en de open leesramen aanwezig in het insert, resulteren niet in de vorming van toxische stoffen of allergenen. Tevens heeft de genetische modificatie het verwilderingspotentieel niet vergroot. Hiernaast kan de genetisch gemodificeerde aardappel alleen uitkruisen naar andere cultuurrassen en niet naar wilde verwanten. De mate van uitkruising is echter gering en indien toch uitkruising optreedt geeft dit geen selectief voordeel aan het nieuwe kruisingsproduct. Na de oogst kunnen op de akker aardappelknollen achter blijven. De knollen zijn vorstgevoelig en zullen de Nederlandse winter gewoonlijk niet overleven. Uit experimenten is gebleken dat een verlaagd amylosegehalte geen effect heeft op de vorstgevoeligheid van aardappelen. Eventuele aardappelopslag wordt in het kader van de verplichte bestrijding van *Phytophthora infestans* verwijderd.

De COGEM is derhalve van mening dat bij de teelt, import en verwerking van onderhavige aardappellijn de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

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  
Voorzitter COGEM

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

# **Titel: Marktaanvraag C/SE/96/3501 voor de teelt, import en verwerking van aardappelen met een verlaagd amylosegehalte**

**COGEM advies: CGM/040610-01**

## **Inleiding**

Onderhavige aanvraag betreft teelt, import en verwerking van de genetisch gemodificeerde aardappellijn EH92-527-1 met een verlaagd amylosegehalte. De aanvraag betreft aardappelen waarbij de vorming van amylose geremd wordt. Voldoende remming heeft tot gevolg dat de aardappelknollen 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. Vanwege zijn samenstelling zal de aardappel alleen toegepast worden in de 'non-food' sector.

Bij de risicoanalyse op milieuveiligheid, behorende bij een marktintroductie van een genetisch gemodificeerd gewas, worden mogelijke effecten van uitkruising, verwildering en incidentele consumptie beoordeeld. Hiertoe wordt een moleculaire karakterisering van het gewas uitgevoerd waarbij onder andere gekeken wordt naar de mogelijke vorming van chimere (samengestelde) eiwitten, de stabiliteit van de insertie en de vorming van mogelijke allergene of toxische stoffen. Tevens worden invloeden op gewaseigen aspecten beoordeeld en wordt een vergelijking gemaakt tussen het uitgangsras en het genetisch gemodificeerde gewas.

### *Voorgaande COGEM adviezen*

Recentelijk heeft de COGEM een positief advies uitgebracht over een veldproef met onderhavige aardappellijn (CGM/040303-01).

Hiernaast heeft de COGEM in het verleden positief geadviseerd over aardappelen met een verlaagd amylosegehalte in het kader van een marktaanvraag (advies uitgebracht op 17-11-1996). Deze aanvraag is uiteindelijk door de aanvrager ingetrokken. Dit onder meer vanwege de aanwezigheid van het *ntpIII* gen.

## 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 het zetmeelras Prevalent als uitgangsras.

De COGEM geeft in haar advies van 29 oktober 2001 (CGM/011029-01) een uitgebreide beschrijving van 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 is van mening dat risico's van verspreiding en overleving van de aardappelplant verwaarloosbaar klein zijn.

De aardappel komt in de Nederlandse flora niet voor en kan niet uitkruisen met wilde verwanten. De aardappel kan wel uitkruisen met andere gecultiveerde aardappelrassen. Overigens is de pollenproductie van onderhavige aardappellijn laag en verliest de plant het merendeel van haar bloemen voordat het pollen rijp is. Bovendien is het pollen relatief zwaar waardoor het slechts enkele meters verspreid kan worden. De mate van uitkruising is daarom ook zeer gering. In het geval er toch uitkruising plaats vindt zal het *kgz* genconstruct en daarmee een verlaagd amylosegehalte, het ontstane kruisingsproduct geen selectief voordeel bieden.

De aanvrager heeft veldexperimenten uitgevoerd waaruit blijkt dat onderhavige aardappellijn geen verhoogd verwilderingspotentieel bezit in vergelijking met het uitgangsras. Bovendien is verwildering van de aardappelplant in Nederland nog nooit waargenomen.

In Nederland wordt de aardappel vegetatief vermeerderd. Na de oogst kunnen deze aardappelknollen op het veld achterblijven. Zoals genoemd in het advies van 3 maart 2004 (CGM/040303-01) overleven aardappelknollen de winter gewoonlijk niet en wordt de aardappelopslag verwijderd in het kader van de verplichte verspreiding van *Phytophthora infestans*. Hiernaast mogen zetmeelaardappelen in het kader van de verplichte wisselteelt in Nederland slechts eens in de twee jaar op hetzelfde perceel geteeld 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 nimmer 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.

### *Vergelijking met het uitgangsras Prevalent*

De COGEM is van mening dat de door de aanvrager uitgevoerde veld- en laboratoriumexperimenten hebben aangetoond dat er geen verschillen in vorsttolerantie bestaan tussen het uitgangsras en onderhavige aardappellijn. Ook zijn er geen verschillen geconstateerd in pollenproductie, zaadzetting, knolvorming en verspreiding. Wel zijn er verschillen gevonden in vitamine C, nitraat, glyco-alkaloïde en mono- en disachariden gehalten. Deze variatie valt echter binnen de normale variatie in gehalten die gevonden kan worden bij aardappel. Het glyco-alkaloïde (waaronder solanine) gehalte is in onderhavige aardappellijn lager dan in het ras Prevalent waardoor dit geen risico's voor mens en milieu oplevert.

De COGEM merkt overigens op dat de vergelijking met het uitgangsras Prevalent door de aanvrager niet duidelijk is beschreven. De aspecten betreffende de rassenvergelijking zijn wel terug te vinden hetzij zeer verspreid over het dossier.

## **Moleculair-biologische aspecten**

### *Beschrijving van de geïntroduceerde genen*

De genetisch gemodificeerde aardappellijn (EH92-527-1) is gegenereerd door middel van een *Agrobacterium* transformatie. Hierbij is gebruik gemaakt van de binaire vector pHoxwG, welke afgeleid is van de vector pBIN19.

De pHoxwG vector bevat naast de pBIN19 sequenties de volgende elementen:

- Pnos, constitutieve promotor, afkomstig van *Agrobacterium tumefaciens*
- *nptIII* gen, coderend voor neomycine fosfotransferase II, afkomstig van transposon Tn5
- Tnos, terminator van het nopaline synthase gen (*nospA*), afkomstig 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 *kgz* gen is van nature al aanwezig in de aardappelplant. Door het inbrengen van een synthetisch *kgz* 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. Er worden door de aanvrager gegevens getoond waaruit blijkt dat het korrelgebonden zetmeelsynthase eiwit in onderhavige aardappellijn niet meer aanwezig is en dat het ingebrachte construct dus daadwerkelijk tot expressie komt. De plant bevat tevens het *nptII* gen dat codeert voor neomycine fosfotransferase II. Expressie van het gen resulteert in resistentie tegen kanamycine en neomycine. Uit de door de aanvrager geleverde gegevens blijkt dat de expressie van het gen stabiel is.

De vector (pHoxwG) 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 levert gegevens waaruit blijkt dat het gen niet in het genoom van aardappelplanten is ingebouwd. Uit deze gegevens blijkt tevens dat de gehele vector 'backbone' niet aanwezig is in onderhavige aardappellijn.

#### *Eigenschappen van het insert*

De aanvrager heeft het insert geanalyseerd waarbij, naast het *nptII* gen 16 open leesramen (ORF's) groter dan 50 aminozuren zijn geïdentificeerd. Hiervan vertonen 11 ORF's geen significante gelijkenis op sequentieniveau met bekende eiwitten. Er werd één ORF geïdentificeerd (ORF4) waarvan de eerste 50 aminozuren een zekere mate van overeenkomst in sequentie met het bleomycine resistentie eiwit (*ble*) vertonen. Bleomycine wordt gebruikt als chemotherapeuticum bij de behandeling van kanker. Vanwege de homologie met het *ble*-resistentiegen is het ORF4 verder onderzocht op transcriptie, translatie en expressie.

De aanvrager laat gegevens zien waaruit blijkt dat ORF4 en het *nptII* gen afgelezen worden op hetzelfde mRNA. Er is echter een stopcodon aanwezig achter het *nptII* gen. Bovendien bevinden het *nptII* gen en ORF4 zich in andere translationele leesramen. Hierdoor wordt translatie (vorming van een eiwit) van ORF4 onwaarschijnlijk. Om dit te bevestigen heeft de aanvrager meerdere experimenten uitgevoerd waaruit blijkt dat het ORF4 niet als eiwit tot expressie komt. Ook heeft de aanvrager aangetoond dat expressie van ORF4 niet leidt tot bleomycine resistentie. De COGEM is van mening dat in het zeer onwaarschijnlijke geval het eiwit toch in zeer lage hoeveelheden (onder de detecteerbare grens) tot expressie zal komen, dit niet leidt tot risico's voor mens en milieu omdat er geen significante overeenkomst in sequentie bestaat tussen het ORF4 eiwit en bekende allergenen.

Tevens is de COGEM van mening dat er geen chimere eiwitten in de overgang van insert naar plant DNA tot expressie kunnen komen. Aan de rechterzijde van het insert is het *nptII* gesitueerd dat afgelezen wordt in de richting van het insert (van het planten DNA af). Hierdoor kunnen er geen nieuwe transcripten en/of fusie-eiwitten

gevormd worden die zich uitstrekken tot in het planten-DNA. Aan de linkerzijde liggen tien stopcodons verspreid over de laatste 200bp van het *kgz* genconstruct. Op deze wijze kunnen er geen relevante ORF's gevormd worden bestaand uit insert en aangrenzend chromosomaal aardappel DNA.

## **Monitoring**

De aanvrager is voornemens tijdens de 'case-specific' monitoring de volgende punten te verifiëren: ORF4 komt niet tot expressie op eiwitniveau, de zetmeelsamenstelling en het glyco-alkaloïdegehalte blijven stabiel en de ingebrachte genen blijven stabiel geïntegreerd. Hiertoe zal de aanvrager plantenmateriaal uit het veld verzamelen en dit vervolgens analyseren. De COGEM acht deze 'case-specifieke' monitoring voldoende.

De COGEM wijst erop dat naast de moleculaire analyse een chemische analyse met jodium mogelijk is die zowel op moleculair niveau als op zetmeelkorrelniveau kan worden uitgevoerd. Jodium kleurt amylose blauw en amylopectine bruin. Er kan op verschillende plaatsen in de keten gekeken worden naar het amylopectine gehalte van de aardappel. Als zetmeelkorrels egaal bruin van kleur zijn duidt dit op een stabiele expressie van het *kgz* genconstruct. Komen er echter ook veel zwarte korrels voor dan kan dit duiden op een instabiele expressie.

## **Conclusies en Advies**

De genetisch gemodificeerde aardappel kan in Nederland niet uitkruisen met wilde verwanten. De aardappel kan wel uitkruisen met andere cultuurrassen, maar de pollenproductie van onderhavige aardappellijn is laag. Aangezien de plant het merendeel van bloemen verliest voordat het pollen rijp is, is de mate van uitkruising zeer gering. Indien toch uitkruising optreedt geeft het *kgz* genconstruct geen selectief voordeel aan het ontstane kruisingsproduct. Hiernaast worden aardappels in Nederland vegetatief vermeerderd. De knollen zijn vorstgevoelig en zullen de Nederlandse winter gewoonlijk niet overleven. Uit experimenten is 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 verwijderd.

Onderhavige aardappellijn is voldoende gekarakteriseerd. De aanvrager heeft aangetoond dat de open leesramen aanwezig in het insert, niet resulteren in de vorming van toxische stoffen of allergenen. Tevens kunnen er geen chimere eiwitten in het overgangsgebied van plant DNA naar insert gevormd worden.

De COGEM is derhalve van mening dat bij de teelt, import en verwerking van onderhavige aardappellijn de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

## 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<sup>e</sup> 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) Hoofdproductschap Akkerbouw. Verordening HPA bestrijding *Phytophthora infestans* bij aardappelen 2003