



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

Rijk Zwaan inhoud/00

Uw brief van

26 mei 2004

Kenmerk

CGM/040628-04

Datum

28 juni 2004

Onderwerp

Agroinoculatie; status van zaden en nakomelingen

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van een adviesvraag van Bureau GGO betreffende een verzoek tot een beslissing in het kader van het Besluit genetische gemodificeerde organismen met de titel 'De status van nakomelingen verkregen uit agro-inoculatie', deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

Rijk Zwaan stelt zich op het standpunt dat zaden (en daaruit verkregen nakomelingen) afkomstig van planten waarop agro-inoculatie is toegepast geen ggo's zijn als bedoeld in het Besluit GGO. Deze stelling is niet in lijn met de vergunningverlening waarbij agro-geïnoculeerde planten, evenals de zaden en pollen afkomstig van deze planten als genetisch gemodificeerd worden aangemerkt en als zodanig moeten worden behandeld. De COGEM is verzocht advies uit te brengen over de status van nakomelingen verkregen van planten die gebruikt zijn voor agro-inoculatie.

De COGEM is van mening dat voor toekennen van een ggo-vrije status aan nakomelingen van agro-geïnoculeerde planten het vereist is dat inbouw van T-DNA in kiembaancellen niet heeft plaatsgevonden en nakomelingen vrij zijn van de bacterie *Agrobacterium*. Gezien het gebrek aan wetenschappelijke gegevens over de problematiek rond inbouw van T-DNA in kiembaancellen en besmetting van zaad raadt de COGEM af om in dit stadium de ggo-vrije status toe te kennen aan nakomelingen van agro-geïnoculeerde planten. De COGEM wijst erop dat indien aangetoond kan worden dat geen T-DNA en *Agrobacterium* aanwezig zijn in én op nakomelingen, aan dergelijke individuen wel een ggo-vrije status kan worden toegekend.

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 flourish extending to the right. A short horizontal line is drawn underneath the signature.

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

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

Titel: Agro-inoculatie; de status van nakomelingen

COGEM advies: CGM/040628-04

Inleiding

Het onderhavige advies betreft een verzoek van Rijk Zwaan Zaadteelt en Zaadhandel B.V. aan de Staatssecretaris van VROM tot het nemen van een beslissing in het kader van het Besluit genetische gemodificeerde organismen (Besluit GGO). Rijk Zwaan stelt zich op het standpunt dat zaden (en daaruit verkregen nakomelingen) afkomstig van planten waarop agro-inoculatie is toegepast geen ggo's zijn als bedoeld in het Besluit GGO. Deze stelling is niet in lijn met de vergunningverlening waarbij agro-geïnoculeerde planten, evenals de zaden en pollen afkomstig van deze planten als genetisch gemodificeerd worden aangemerkt en als zodanig moeten worden behandeld. De COGEM is verzocht advies uit te brengen over de status van nakomelingen verkregen van planten die gebruikt zijn voor agro-inoculatie.

Bij agro-inoculatie worden plantendelen in contact gebracht met genetisch gemodificeerde bacteriën van de soort *Agrobacterium tumefaciens*, waarbij DNA overdracht van de bacterie naar de plant plaatsvindt. Rijk Zwaan wil de techniek van agro-inoculatie inzetten bij de productie van planten. De zaden die van deze planten worden verkregen kunnen worden gebruikt om via het proces van plantenveredeling nieuwe rassen te kweken. De zaden van deze nieuwe rassen wenst Rijk Zwaan vervolgens op de markt te zetten. De GGO-vrije status van de zaden is daarbij van groot belang.

Agrobacterium tumefaciens

A. tumefaciens is een gramnegatieve plantpathogene bodembacterie behorende tot de familie van *Rhizobiaceae*. De bacterie heeft een zeer brede waardreeks, komt wereldwijd voor en bevindt zich voornamelijk in de rhizosfeer van planten (1). *A. tumefaciens* is in staat tumoren te induceren in geïnfecteerde planten. In tegenstelling tot andere plantpathogene bacteriën die ingrijpen op de fysiologie van de plant door stoffen zoals toxines of groeiregulatoren uit te scheiden, modificeert *A. tumefaciens* het genetische materiaal van de waardplant. De modificatie is het resultaat van de overdracht vanuit de bacterie en integratie van een bacterieel-DNA-fragment in het plantengenoom. Dit specifieke DNA-fragment wordt 'transfer-DNA' of kortweg T-DNA genoemd en is afkomstig van het bacteriële tumorinducerende (Ti) plasmide. In geïnfecteerde planten leidt expressie van oncogenen gelegen op het T-DNA tot vorming van de tumoren (2).

Genetische modificatie van planten met behulp van *Agrobacterium tumefaciens*

Het vermogen van de bacterie om genetisch materiaal te integreren in het plantengenoom en zijn brede waardplantenreeks maakt *A. tumefaciens* tot een belangrijk gereedschap voor de productie van transgene planten. Hierbij worden de tumorinducerende (=onco)genen op het T-DNA te vervangen door één of meerdere genen die verantwoordelijk zijn voor de gewenste eigenschap. Het veranderde T-DNA wordt op dezelfde wijze als het natuurlijke T-DNA in het plantengenoom geïntegreerd. Vanwege de afwezigheid van oncogenen blijft tumorvorming in dit geval uit en kunnen uit de plantencellen met het stabiel in het genoom geïntegreerde T-DNA fertiele transgene planten worden geregenereerd met de gewenste eigenschap. (3). Op deze wijze zijn veel van de genetische gemodificeerde gewassen die wereldwijd op de velden staan verkregen.

Agro-inoculatie

Infectie met *A. tumefaciens* en transformatie kan worden bewerkstelligd met vrijwel alle delen van een plant. In de praktijk wordt vooral gewerkt met delen en ontwikkelingsstadia die in staat zijn efficiënt te regenereren. Deze voorkeur speelt niet bij de zogenaamde agro-inoculatie, waarbij het niet de bedoeling is transgene planten te regenereren. Bij agro-inoculatie wordt de bacterie met behulp van een injectiespuit de plant (meestal een blad) ingespoten waarbij expressie van het T-DNA in het geïnfecteerde weefsel plaatsvindt (5). Overdracht van het T-DNA naar de kern van de plantencel hoeft hierbij niet te leiden tot integratie van het T-DNA in het genoom. De genen op het T-DNA komen dan alleen 'transient' tot expressie (6).

Door *A. tumefaciens* voorzien van een avirulentie-gen van een pathogeen in planten te inoculeren wordt het mogelijk om vrij eenvoudig planten te toetsen op aanwezigheid van het bijbehorende resistentiegen tegen het betreffende pathogeen (7).

Tevens kunnen met behulp van agro-inoculatie epigenetische veranderingen in de plant en mogelijk ook in het zaad worden bewerkstelligd. Het inbrengen van een transgen kan bijvoorbeeld tot gevolg hebben dat genen in de plant worden uitgeschakeld (silencing) (4). De gevolgen van uitschakeling hoeven daarbij niet beperkt te blijven tot de inoculatieplaats maar kunnen doorzetten in de overige delen van de plant en mogelijk zelfs van invloed zijn op de zaadzetting.

Overwegingen

Zoals hierboven weergegeven zal bij agro-inoculatie zowel stabiele inbouw als 'transiente' inbouw plaatsvinden van het T-DNA op de plaats van inoculatie. Dit ingebouwde T-DNA in het genoom of de aanwezigheid van het T-DNA in de nucleus van geïnfecteerde cellen op de inoculatieplek zal niet in de zaden terechtkomen en is derhalve niet overerfbaar. Echter de methode, het gebruik van levende transgene

bacteriën, die zich theoretisch zouden kunnen verspreiden door de hele plant, maakt dat niet zonder meer gesteld kan worden dat nakomelingen verkregen van agro-geïnoculeerde planten derhalve geen ggo's zijn. Om te kunnen stellen dat geen T-DNA in zaden afkomstig van agro-geïnoculeerde planten aanwezig is, zal moeten worden aangetoond dat geen verspreiding van *Agrobacterium* door of op de plant heeft plaatsgevonden óf dat deze verspreiding niet heeft geleid tot inbouw van T-DNA in de eicel, de gameet of het embryo.

Daarnaast is het essentieel dat de zaden en daarmee eventuele nakomelingen niet besmet zijn met de gebruikte *Agrobacterium*-stam. Besmet zaad of een besmette plant kunnen als infectiebron dienen. Met name in de rhizosfeer kan tussen bacteriën uitwisseling van plasmiden optreden. Aangetoond is dat uitwisseling zich niet beperkt tot bacteriën van een eendere species maar dat tevens tussen genera uitwisseling van plasmiden optreedt. Tevens is overdacht van plant naar plant niet uit te sluiten. *Agrobacterium* kan overgedragen worden door floëemvoedende insecten zoals wittevliegen, maar ook via vegetatieve vermeerdering of via de bodem, het betreft hier tenslotte een bodembacterie (1).

Alleen indien blijkt dat T-DNA niet ingebouwd is in de nakomelingen, en zaad niet besmet is met de gebruikte *Agrobacterium tumefaciens*-stam kan aannemelijk worden gemaakt dat nakomelingen niet als ggo moeten worden gezien.

Inbouw van T-DNA

Inbouwen van het T-DNA door *A. tumefaciens* in de eicel dan wel gameten van de geïnoculeerde plant kan theoretisch gezien op twee manieren plaatsvinden. *Agrobacterium* verplaatst zich na inoculatie door de plant en is in staat om bij aanleg van eicellen of gameten deze te infecteren, óf *Agrobacterium* verplaatst zich aan de buitenkant van de plant en ziet kans om tijdens de bloei de eicel of gameten te infecteren. In hoeverre deze scenario's ook werkelijk plaats zullen vinden is sterk afhankelijk van een aantal factoren. Zo zal *Agrobacterium* zich niet alleen moeten handhaven, maar ook in staat moeten zijn zich te verspreiden door of via de plant. Hierbij zal de bacterie, afhankelijk van het stadium waarin de plant zich bevindt en in welk deel van de plant de inoculatie plaatsvindt, in staat moeten zijn de tijdsduur tot bloeiaanleg en afstand tot het bloemhoofd te overbruggen.

Gezien de bevindingen van onder meer Matzk et al. (1996) (1) kan niet worden uitgesloten dat, wanneer eenmaal in de plant, *Agrobacterium* zich daadwerkelijk kan handhaven en verspreiden. In transgene tabak verkregen door transformatie met genetisch gemodificeerde *A. tumefaciens* werd achttien maanden na transformatie de bacterie inclusief het binaire plasmide zowel in als op de plant aangetroffen, herhaalde pogingen om de bacterie met behulp van antibiotica (cefotaxime en carbenicilline) kwijt te raken ten spijt. Tevens bleek dat *Agrobacterium* niet alleen in staat was te overleven maar zich ook te vermenigvuldigen op én in de gastheerplant en zich

systemisch door de plant te verspreiden. Gedurende de achttien maanden die getoetst werden, werd in alle delen van de plant *A. tumefaciens* aangetroffen met uitzondering van de bloemen en het zaad. In tabaksplanten in de grond werd de *A. tumefaciens* voornamelijk aangetroffen in onderste delen van de plant; de wortels en de onderstengel. De auteurs geven hierbij aan dat gezien het feit dat *A. tumefaciens* zich lijkt te beperken tot de lagere regio's van de plant de kans klein is dat het nageslacht geïnfecteerd zal raken.

Waar T-DNA via intern transport voor zover bekend nooit is aangetroffen in de eicel, gameet of embryo, zijn wel gegevens bekend over inbouw van het T-DNA in het nageslacht via een besmetting van buitenaf. Bij het gebruik van de zogeheten 'floral dip'-methode, waar bloemhoofdjes in *A. tumefaciens*-suspensie worden gedoopt blijkt het mogelijk om inbouw van het T-DNA in het zaad te kunnen bewerkstelligen (8). Op dit moment leidt de methode in zeer lage percentages tot succes en bij een zeer beperkt aantal planten. Naast *Arabidopsis thaliana* (zandraket), waar de methode voor ontwikkeld is, zijn tot op heden alleen successen geboekt bij de verwante soorten *Brassica napus* (koolzaad) (9) en *Raphanus sativus* (radijs) (10). Hiermee lijkt de methode zich vooralsnog te beperken tot de familie der *Brassicaceae* (*Cruciferae*); de kruisbloemenfamilie. Een familie waaronder tevens de eetbare koolsoorten vallen (11).

Besmetting van het zaad met A. tumefaciens

Zoals in de vorige paragraaf al naar voren werd gebracht zal de bacterie in staat zijn zich te handhaven, te vermenigvuldigen en te verspreiden in en op de plant. De kans dat zaden na oogsten besmet zijn met *Agrobacterium* is derhalve aanwezig, zeker gezien de hoge concentraties die worden toegediend. Mede gezien het feit dat het hier een bodembacterie betreft en in de grond vermenigvuldiging kan optreden zou een dergelijke besmetting kunnen betekenen dat de planten tijdens het kiemings- en of groeiproces geïnfecteerd raken, waarbij de vraag rijst in hoeverre deze infectie detecteerbaar is.

Toetsen van nakomelingen

Uit voorgaande blijkt dat niet uitgesloten kan worden dat T-DNA ingebouwd zal zijn in het zaad, of dat het zaad besmet zal zijn met de *Agrobacterium*. Bij inbouw van het T-DNA in het zaad kunnen nakomelingen relatief eenvoudig getest worden op de aanwezigheid van het T-DNA. Inbouw van het T-DNA in de eicel, gameet of embryo heeft als gevolg dat alle cellen van de nakomeling het T-DNA bezitten. Screenen van een plant op de aanwezigheid van het T-DNA wordt hierdoor vergemakkelijkt.

Waar bij inbouw van T-DNA in de nakomelingen, naar verwachting alle cellen van de plant het T-DNA bezitten zal dit bij een besmetting vanuit de bodem niet het geval zijn. Daarbij zullen binnen de plant concentratieverschillen aanwezig zijn. Toetsen op

de aanwezigheid van *Agrobacterium* wordt hierdoor sterk bemoeilijkt. Het uitvoeren van een toets op de aanwezigheid van T-DNA lijkt in deze onvoldoende bevestiging te kunnen geven over de aanwezigheid van de bacterie in de plant. Wil met zekerheid gesteld kunnen worden dat *Agrobacterium* niet in de plant aanwezig is, zal aangetoond moeten worden dat het zaad vooraf aan uitzaaien vrij van besmetting met *Agrobacterium* is.

Een factor die een rol zal spelen bij de kans op inbouw van T-DNA of de besmettingsgraad van *Agrobacterium* zijn de waardplant en de bacteriestam die gebruikt worden. Gezien de verschillen in transformatie-efficiëntie bij gebruik van verschillende *A. tumefaciens*-stammen en verschillende plantensoorten (3) lijkt het waarschijnlijk dat ook handhaving en verspreiding van de bacterie in de plant of op de plant hiervan afhankelijk zal zijn. De beperking van de 'floral dip'-methode tot de kruisbloemenfamilie bevestigt dat waardplanten een rol spelen bij de interactie met *Agrobacterium*. Aangenomen kan worden dat pogingen om via de 'floral dip'-methode transgene nakomelingen te verkrijgen voor meerdere plantensoorten is getest. Het kunnen omzeilen van weefselkweektechnieken en regeneratie van getransformeerde cellen maakt deze methode tot zeer aantrekkelijk, zeker voor planten waarbij regeneratie moeizaam verloopt. Bovendien is deze methode in veel gevallen minder tijdrovend.

Advies

Gezien het bovenstaande is de COGEM van mening dat niet volledig uitgesloten kan worden dat na agro-inoculatie geen T-DNA aanwezig zal zijn in de nakomelingen. Hoewel inbouw van T-DNA in eicel en gameten via intern transport onwaarschijnlijk is kan niet zonder meer gesteld worden dat uitgesloten is dat T-DNA ingebouwd zal worden. De resultaten van de zogenaamde 'floral dip'-methode tonen aan dat inbouw van T-DNA in kiembaancellen mogelijk is. De COGEM vindt het echter aannemelijk dat indien onverhoopt toch inbouw van T-DNA in het zaad plaatsvindt een gevalideerde testmethode zekerheid kan bieden over de aanwezigheid van T-DNA.

Naast de afwezigheid van T-DNA is het tevens essentieel dat het zaad niet besmet is met de gebruikte *Agrobacterium*-stam. De COGEM is van mening dat niet uit te sluiten valt dat de zaden afkomstig van agro-geïnoculeerde planten besmet zullen zijn met *Agrobacterium*. De COGEM stelt hierbij de vraag of deze besmetting op afdoende wijze bestreden kan worden. Wetenschappelijke gegevens over enerzijds de aanwezigheid van de *Agrobacterium* op het zaad of in de plant en anderzijds de efficiëntie van decontamineermethodes ontbreken. De COGEM wil in deze opmerken dat zij van mening is dat onderzoeksresultaten verkregen voor een plantensoort,

gezien het verschil in interactie tussen plant en bacterie, niet één op één vertaalt kunnen worden naar andere plantensoorten.

De COGEM is van mening dat toekenning van een ggo-vrije status aan nakomelingen van agro-geïnoculeerde planten mogelijk is als op afdoende wijze is aangetoond dat geen inbouw van T-DNA plaats heeft gevonden en eventuele besmetting van het zaad op effectieve wijze bestreden kan worden. Gezien het gebrek aan wetenschappelijke gegevens over de problematiek rond inbouw van T-DNA in kiembaancellen en besmetting van zaad raadt de COGEM af om in dit stadium de ggo-vrije status toe te kennen aan nakomelingen van agro-geïnoculeerde planten. De COGEM wijst erop dat indien aangetoond kan worden dat geen T-DNA en *Agrobacterium* aanwezig zijn in én op nakomelingen aan dergelijke individuen een ggo-vrije status zou kunnen worden toegekend.

De COGEM is tevens gevraagd een uitspraak te doen ten aanzien van het gebruik van *Escherichia coli* bij agro-inoculatie-experimenten. De COGEM heeft hierover een eendere mening als bij het gebruik van *Agrobacterium*. Hoewel aannemelijk is dat overdacht van genetisch materiaal vanuit *E.coli* vanwege de afwezigheid van de benodigde virulentiegenen vrijwel uit te sluiten is, ontbreekt ook hiervoor wetenschappelijk bewijs. Bij het gebruik van *Salmonella* in combinatie met zoogdiercellen is met lage frequentie overdracht van DNA waargenomen. Theoretisch gezien kan dit ook bij *E. coli* gebeuren. Tevens is de kans op besmetting van zaad of plant met de gebruikte *E. coli*-stam aanwezig en daarmee de risico van overdracht van genetisch materiaal tussen *E. coli* en andere bacteriën. Hierbij dient wel te worden opgemerkt dat, in vergelijking met *Agrobacterium*, *E. coli* zeer beperkt overleeft in de bodem.

De COGEM wijst erop dat een beslissing op nationaal niveau met betrekking tot het toekennen van een ggo-vrije status aan nakomelingen van agro-geïnoculeerde planten verschillen in interpretatie van de Europese wet- en regelgeving tussen de lidstaten van de Europese Unie tot gevolg kan hebben. De COGEM acht derhalve overleg op Europees niveau betreffende de agro-inoculatie-kwestie gewenst.

Referenties

1. Matzk A, Mantell, S, Schiemann J, 1996. Localization of persisting agrobacteria in transgenic tobacco plants. *Molecular Plant - Microbe Interactions* 9: 373-381.
2. Tzfira T, Citovsky V., 2000. Pathogen profile. From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. *Molecular Plant Pathology* 1: 201-212.
3. Gelvin S B, 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "Gene-jockeying" Tool. *Micobiology and Molecular Biology Reviews* March. p.16-37.
4. Fischer R, Vaquero-Martin C, Sack M, Drossard J, Emans N, Commandeur U, 1999. Review. Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants. *Biotechnol.Appl.Biochem.* 30: 113-116.
5. Van der Hoorn R A L, Laurent F, Roth R, De Wit P J G M, 2000. Agroinfiltration is a versatile tool that facilitates comparative analyses of Avr9/CF-9-induced and Avr4/Cf-4-induced necrosis. *Molecular Plant - Microbe Interactions* 13: 439-446.
6. Kapila J, De Rycke R, Van Montagu M, Angenon G., 1997. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science* 122: 101-108.
7. Schöb H, Kunz C, Meins F, 1997. Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration: a simple, rapid method for investigating sequence requirements for gene silencing. *Mol. Gen. Genet.* 256: 581-585.
8. Clough S J, Bent A F, 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16: 735-743.
9. Wang W C, Menon G, Hansen G, 2003. Development of a novel *Agrobacterium*-mediated transformation method to recover transgenic *Brassica napus* plants. *Plant Cell Reports* 22, 274-281.
10. Curtis I S, Nam H G, 2001. Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. *longipinnatus* Bailey) by floral-dip method – plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency. *Transgenic Research* 10, 363-371.
11. Van der Meijden R, 1996. Heukels' Flora van Nederland. Tweeëntwintigste druk, eerste bijdruk.