

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	Uw brief van	Kenmerk	Datum
DGM/SAS IM 04-002	28 oktober 2004	CGM/041123-01	24 november 2004

Onderwerp  
Advies ontwerpbeschikking DGM/SAS IM 04-002

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van de ontwerpbeschikking DGM/SAS IM 04-002 en de vergunningaanvraag, getiteld 'Toetsing van genetisch gemodificeerde niet-bloeiende appelbomen met verhoogde schimmelresistentie in het veld', van Plant Research International B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

### **Samenvatting:**

De COGEM is verzocht te adviseren over de milieurisico's van kleinschalige (klasse 1) veldproeven met genetisch gemodificeerde appelbomen (*Malus pumila*) met een verhoogde schimmelresistentie. Het doel van de voorgenomen werkzaamheden is het testen van de effectiviteit van door hordothionine opgewekte schimmelresistentie in appelbomen. Hordothionine is een eiwit dat afkomstig is uit gerst en dat een rol speelt bij schimmelresistentie.

Het betreft een kleinschalige proef waarbij wordt voorkomen dat de genetisch gemodificeerde bomen in bloei komen. Hierdoor is het risico van verspreiding van pollen en zaden en incidentele consumptie van daaruitgevormde appels door de mens uitgesloten. Daarbij zullen door de opzet van de proef mogelijke onverwachte effecten van het in de appelbomen tot expressie gebrachte hordothionine op niet-doelorganismen ten hoogste beperkt en tijdelijk van aard zijn.

De COGEM heeft 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 flourish 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: Veldproef met genetisch gemodificeerde niet-bloeiende appelbomen met verhoogde schimmelresistentie**

**COGEM advies: CGM/041123-01**

## **1. Inleiding**

De COGEM is verzocht te adviseren over de milieurisico's van kleinschalige veldproeven met genetisch gemodificeerde niet-bloeiende appelbomen (*Malus pumila*) met verhoogde schimmelresistentie. De vergunningaanvrager, Plant Research International, is voornemens om de effectiviteit te testen van niet-bloeiende appelbomen met verhoogde schimmelresistentie (vergunningaanvraag: BGGO IM 04-002).

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 worden gebracht dat in de donor (gerst) een rol speelt bij schimmelresistentie. De appelbomen zullen worden getest op resistentie tegen *Venturia inaequalis*, (appelschurft), *Podospaera leucotricha* (meeldauw) en *Nectria galligena*, (vruchtboomkanker). Indien de opgewekte schimmelresistentie in de appelbomen effectief is gebleken, kan volgens de aanvrager de toepassing van deze genetisch gemodificeerde planten mogelijk leiden tot een verminderd gebruik van bestrijdingsmiddelen.

De vergunningaanvraag betreft kleinschalige werkzaamheden met genetisch gemodificeerde niet-bloeiende appelbomen in de gemeentes Wageningen, Ede of Overbetuwe.

### *Voorgaande COGEM adviezen*

De COGEM heeft in het verleden positief geadviseerd over dezelfde vergunningaanvraag voor niet-bloeiende appelbomen met verhoogde schimmelresistentie (CGM/030127-05) en voor een wijziging op die vergunning, (CGM/031124-03). Deze vergunning is in juli 2004 vernietigd door de Raad van State op juridische en procedurele gronden. Volgens de Raad van State was in de vergunning niet inzichtelijk gemaakt dat de risicoanalyse conform de nieuwe Europese richtlijn 2001/18 is uitgevoerd.

In de onderhavige nieuwe ontwerpbeschikking (IM 04-002) zijn een aantal aanpassingen doorgevoerd waaruit blijkt dat de onderliggende risicoanalyse volgens 2001/18 is uitgevoerd. In dit advies heeft de COGEM inzichtelijk willen maken dat ook zij haar risicoanalyse conform de Europese richtlijn uitvoert.

## 2. Milieurisicoanalyse

Bij de risicobeoordeling van introductie in het milieu van genetisch gemodificeerde organismen (ggo's), zoals die door de COGEM wordt uitgevoerd, wordt gekeken naar de effecten die het ggo kan hebben op mens en milieu (waarbij de mens als integraal onderdeel van het milieu wordt beschouwd).

Onder risico wordt verstaan de combinatie van de gevolgen van een gevaar en de kans dat deze gevolgen zich kunnen voordoen. De mogelijke schadelijke effecten van (toepassing van) een ggo worden vergeleken met die van het ongemodificeerde organisme (de zogenaamde baseline) waaruit het ggo is afgeleid. Bij introductie in het milieu wordt door de COGEM de staande landbouw en de klassieke veredeling als baseline voor genetische gemodificeerde gewassen gebruikt (CGM/021017-06).

De uitgangspunten en de methodiek van de milieurisicobeoordeling is in de EU richtlijn 2001/18 en de bijbehorende bijlagen beschreven. Hierin is vastgelegd dat bij de milieurisicobeoordeling zowel gekeken wordt naar mogelijk directe als naar indirecte schadelijke effecten van het ggo. Om tot een risico-inschatting te komen worden de volgende stappen doorlopen: de identificatie van kenmerken die schadelijke effecten kunnen hebben; de evaluatie van mogelijke gevolgen van het mogelijk optreden van schadelijke effecten; de evaluatie van de kans op het optreden van mogelijke schadelijke effecten; een schatting van het risico dat aan elk bepaald kenmerk van het ggo is verbonden; de bepaling van risicomanagementmaatregelen; en de bepaling van het algeheel risico van het ggo.

De COGEM heeft eerder richtlijnen opgesteld voor de beoordeling van veldproefaanvragen met genetisch gemodificeerde planten (CGM/990518-41). In deze richtlijnen worden criteria beschreven voor een klasse-indeling van veldproeven teneinde mogelijke milieurisico's te voorkomen. Indien weinig kennis beschikbaar is worden alleen kleinschalige werkzaamheden toegelaten waarbij eventuele nadelige effecten verregaand ingeperkt moeten worden. Voor grootschalige veldproeven met minder inperkende voorschriften is meer kennis van het ggo vereist. Deze kennis kan eventueel verkregen worden uit eerdere kleinschalige veldproeven, of andere bronnen. Het veldexperiment in de onderhavige aanvraag betreft een klasse 1 veldexperiment. Dit houdt in dat de jaarlijkse maximale omvang van de proef één hectare bedraagt op slechts één locatie. In de onderhavige aanvraag wordt verzocht om de werkzaamheden te mogen uitvoeren op één locatie met een totaal oppervlak van maximaal 0,385 hectare. Eventuele schadelijke effecten moeten hierbij beperkt blijven tot het proefobject, hetgeen onder meer inhoudt dat verspreiding van de ingebrachte genen buiten het proefobject moet worden voorkomen.

In het kader van onderhavige aanvraag kijkt de COGEM naar de risico's voor mens en milieu die verbonden zijn aan het introduceren van genetische gemodificeerde appelbomen met een verhoogde schimmelresistentie in het milieu. Zowel directe als

indirecte effecten worden beoordeeld. Hierbij is de kans op verspreiding door pollen of zaden, het eventueel uitkruisen van appel met wilde verwanten of andere verwanten, mogelijke veranderingen in persistentie en invasiviteit van de plant en verwildering van belang. Daarnaast wordt gekeken naar eventuele nadelige effecten van de verspreiding van de ingebrachte genen in het milieu. Ook incidentele consumptie of vraat en mogelijke toxische of allergene effecten op mens en dier zijn onderwerp van de risicoanalyse. Effecten op niet-doel organismen zouden kunnen leiden tot een verstoring van voedselketens of ecosystemen. Ook kan een eiwit mogelijk intact blijven in insecten, waarna het door insecten verspreid kan worden vanuit het proefveld. Mogelijke schadelijke effecten op de bodemmicroflora zouden als gevolg een verstoring in de nutriëntenkringloop in de bodem kunnen hebben.

Teneinde de bovenstaande aspecten te kunnen beoordelen wordt een aantal factoren in ogenschouw genomen: de eigenschappen van het gastheerorganisme waarin de transgenen zijn ingebracht, de kenmerken van de ingebrachte transgenen, de mogelijke effecten van deze genen, de kenmerken van het ggo en de mogelijke interactie met het milieu waarin het ggo geïntroduceerd wordt.

## **2.1 Eigenschappen 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. In de onderhavige aanvraag wordt gebruik gemaakt van twee cultivars: Elstar en Gala.

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 drie tot vijf jaar voordat er bloei en eventueel zaadzetting optreedt. Gewoonlijk worden vruchten 130 tot 160 dagen na start van de bloei geoogst.

Appel kan zich verspreiden door middel van pollen en door middel van zaden. Verspreiding van pollen kan plaatsvinden door uitkruising met verwanten in boomgaarden, plantsoenen, tuinen en met wilde appel. In een studie naar 'geneflow' in appel blijkt 'geneflow' tussen gecultiveerde en wilde appel zeer beperkt (1). Desondanks kan uitkruising leiden tot fertiele nakomelingen. In Nederland komen tientallen *Malus* soorten voor, die zijn aangeplant in parken en tuinen voor hun sierwaarde of die geteeld worden voor de consumptie. Daarnaast komen in Nederland talrijke bastaarden met cultuurvormen voor (2). Hieruit blijkt dat appel kan verwilderen. Aangezien appel een langzame groeier is met een matige concurrentiekracht (3) zal verwildering niet leiden tot sterke onkruidvorming.

Naast uitkruising kan appel zich verspreiden door middel van zaden. Verspreiding vindt hoofdzakelijk plaats via verspreiding van klokhuisen waarbij ook de zaden

verspreid worden en door verspreiding van appels en/of zaden door dieren.

In de onderhavige aanvraag zullen de appelbomen niet tot bloei komen en zullen er dus geen pollen en zaden gevormd worden.

## 2.2 Eigenschappen van de ingebrachte genen

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

- *hth*, coderend voor alpha-hordothionine (zaadeiwit);
- *gus*, coderend voor glucuronidase ( $\beta$ -glucuronidase activiteit);
- *nptIII*, 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 is onder controle van een prokaryote promotor. Alleen genen die onder controle zijn van 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 *nptIII* gen (selectiegen). Het *nptIII* gen wordt niet in de plant ingebouwd.

De resistentie van appelbomen tegen plantpathogene schimmels wordt verhoogd door de bomen genetisch te modificeren met een gen dat codeert voor een type I alpha-hordothionine. Thioninen zijn laagmoleculaire eiwitten die in diverse plantenweefsels kunnen worden geproduceerd. Type I thionine, waartoe het alpha-hordothionine behoort, komt voor in het endosperm van zaden van de meeste grassen zoals tarwe en gerst. Het alpha-hordothionine uit de onderhavige aanvraag is afkomstig uit gerst. Van type I thioninen is bekend dat zij anti-microbiële activiteit vertonen en werkzaam zijn tegen een breed spectrum van Gram-positieve en Gram-negatieve bacteriën, plant pathogene schimmels en gisten. De eiwitten veroorzaken onder meer porievorming in de celmembraan met als gevolg dat de cellen lek raken en afsterven (4).

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. Er zijn geen nadelige effecten van hordothionine op de mens bekend.

Daarnaast bevat de bovenstam het merkergen *gus*, dat gebruikt is in het transformatieproces. Het *gus* gen is afkomstig van de bacterie *Escherichia coli* en codeert voor het enzym  $\beta$ -glucuronidase. Dit enzym is een exohydrolase dat specifiek de hydrolyse van het  $\beta$ -D-glucuroniden tot het aglycon en D-glucuronzuur katalyseert.  $\beta$ -Glucuronidase wordt onder meer aangetroffen in verschillende zoogdieren,

weekdieren, insecten, planten, schimmels en prokaryoten (5).

De bovenstam is ook resistent tegen kanamycine (door de aanwezigheid van het *nptII* gen). Kanamycine wordt als antibioticum niet toegepast in de humane en veterinaire gezondheidszorg en resistentie is wijdverbreid in de natuur (6).

### **3. Overwegingen en advies**

#### **3.1 Overweging van mogelijke risico's van het genetisch gemodificeerde gewas**

Appel kan zich verspreiden door middel van appels, pollen en zaden. De verspreiding van pollen en zaden wordt in de onderhavige aanvraag voorkomen doordat de appelbomen niet tot bloei komen en dus ook geen appels gevormd worden. Bloei van de bomen wordt voorkomen door bespuitingen met gibberellinen. Dit is een methode die in fruitteeltonderzoek vaker gebruikt wordt (7). Daarbij is in de vergunning voorgeschreven dat de bloeiwijzen die mogelijk toch ontstaan met de hand verwijderd moeten worden. De COGEM is van mening dat deze methoden uitsluiten dat bloemen gevormd kunnen worden en dat daarmee voldoende en effectieve maatregelen worden genomen om verspreiding van zaden en pollen te voorkomen. Verwildering van de plant en verspreiding van de ingebrachte genen wordt daarmee verhinderd.

#### **3.2 Overweging van mogelijke risico's van de ingebrachte genen**

##### *Mogelijke risico's van het hth-gen*

De bloei van de transgene appelbomen wordt voorkomen, zodat geen appelvorming zal plaatsvinden en consumptie door mens derhalve is uitgesloten. Een mogelijk nadelig effect van hordothionine op de mens is overigens onbekend. Vraat aan bladeren door dieren, hoofdzakelijk insecten, is niet uitgesloten. Het is niet duidelijk of het eiwit een negatief effect kan hebben op insecten. 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 is de COGEM van mening dat mogelijke effecten op de insectenpopulatie ten hoogste lokaal en tijdelijk van aard zullen zijn.

Effecten op micro-organismen kunnen niet worden uitgesloten, gezien de anti-microbiële werking van het hordothionine (4). 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 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 is onwaarschijnlijk, 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 worden (8). De COGEM is van mening dat gezien het bovenstaande en de grootte van het experiment het onaannemelijk is dat hoge concentraties hordothionines, dat wil zeggen hoger dan bij teelt van gerst, zich in de bodem zullen voordoen. Mogelijke effecten op de bodemflora zullen derhalve beperkt en tijdelijk van aard zijn.

#### *Mogelijke risico's van het merker gen *gus**

In de genetische gemodificeerde appelbomen is het *gus* gen, coderend voor het enzym  $\beta$ -glucuronidase, ingebracht. 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 (5). Daarnaast worden geen schadelijke effecten verwacht van de expressie van het *gus* gen omdat het enzym waarvoor het gen codeert niet toxisch is en ook de reactieproducten niet toxisch of allergeen zijn (5).

#### *Mogelijke risico's van de selectiegenen (antibioticumresistentiegenen *nptII* en *nptIII*)*

Twee selectiegenen zijn 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. 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. De COGEM is evenwel van mening dat de aanvrager afdoende de afwezigheid van het *nptIII* gen heeft aangetoond (met behulp van PCR en Southern blot-analyse) in alle genetisch gemodificeerde lijnen van appelbomen die in de veldproeven gebruikt gaan worden.

Het *nptII* gen codeert voor kanamycine resistentie. Kanamycine wordt als antibioticum niet toegepast in de humane en veterinaire gezondheidszorg. Daarnaast komen kanamycine resistentiegenen wijdverbreid in de natuur voor en het is niet te verwachten dat het *nptII* gen de plant een selectief voordeel geeft in de natuur (6).

### **3.3 Advies**

De COGEM heeft tegen de in de aanvraag beschreven werkzaamheden, onder de voorgestelde voorwaarden, geen bezwaar en acht de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein. Het betreft een toestemming voor klasse 1 werkzaamheden, op maximaal 1 locatie van maximaal 0,385 hectare per locatie. De bloei van de transgene appelbomen wordt onderdrukt, zodat noch appelvorming noch uitkruising naar wilde en gecultiveerde verwanten kan plaatsvinden. Mogelijke onverwachte effecten van het



in de appelbomen tot expressie gebrachte hordothionine op niet-doelorganismen zullen ten hoogste beperkt en tijdelijk van aard zijn.

De COGEM wijst erop dat bij een eventuele toekomstige aanvraag voor opschaling van de werkzaamheden er gegevens aangeleverd moeten worden over de effecten op het bodemecosysteem in relatie tot het werkingsspectrum, 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. Het verdient aanbeveling reeds bij dit experiment oriënterende metingen van beide aspecten uit te voeren.

#### **4. Additionele opmerkingen**

De COGEM acht het van belang op te merken, en vooruitlopend op een mogelijke aanvraag voor opschaling van de experimenten, dat de informatie van de aanvrager deels onvolledig is. De ontbrekende informatie is 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 het volgende punt opheldering moeten geven:

De aanvrager vermeldt dat hordothioninen niet toxisch zijn voor dieren, maar er wordt geen informatie aangeleverd waaruit blijkt dat dit het geval is. Een betere onderbouwing van dit standpunt is gewenst.

#### **5. Referenties**

1. Coart, E., Vekemans, X., Smulders, M. J., Wagner, I., Van Huylenbroeck, J., Van Bockstaele, E., and Roldan-Ruiz, I. (2003). Genetic variation in the endangered wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) in Belgium as revealed by amplified fragment length polymorphism and microsatellite markers. *Mol Ecol* **12**, blz. 845-857
2. Meijden, van der R. (1996). Heukels' Flora van Nederland, 22e druk, Wolters-Noordhoff bv. Groningen
3. Bosplantsoen, IPC Groene Ruimte tiende druk 1997 redactie Voorhoeve A. G. Hontolez M.. blz. 123
4. Florack, D. E. and Stiekema, W. J. (1994). Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. *Plant Mol Biol* **26**, blz. 25-37
5. Gilissen, L. J., Metz, P. L., Stiekema, W. J., and Nap, J. P. (1998). Biosafety of *E. coli* beta-glucuronidase (GUS) in plants. *Transgenic Res* **7**, blz. 157-163
6. Nap, J. P., Bijvoet, J., and Stiekema, W. J. (1992). Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants. *Transgenic Res* **1**, blz. 239-249

7. Unrath, C. R. and Whitworth J. (1991). Suppression of apple bloom with gibberellin sprays. *Journal of Horticultural Science* **66**, blz. 155-157
8. Lüttge, U. and Higinbotham, N. (1979). *Transport in Plants*, Springer-Verlag New York. 73-74