

Aan de minister van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
Mevrouw J.C. Huizinga-Heringa
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 25 februari 2010
KENMERK CGM/100225-02
ONDERWERP Advies: bewijsvoering voor aantonen hybride na kruising

Geachte mevrouw Huizinga,

Naar aanleiding van een adviesvraag van het ministerie van VROM over het aantonen van hybrides tussen twee plantensoorten, adviseert de COGEM als volgt.

Samenvatting

Planten die zijn vervaardigd met behulp van celfusie of protoplastfusie worden volgens Richtlijn 2001/18/EG aangemerkt als genetisch gemodificeerd organisme (ggo). Deze planten kunnen uitgezonderd worden van de ggo-regelgeving, als de ouders kunnen kruisen met behulp van conventionele veredelingsmethoden. Veredelingsbedrijven overleggen hiervoor gegevens aan het ministerie van VROM, waarmee ze aantonen dat een kruising tussen twee planten een hybride plant oplevert. VROM heeft de COGEM verzocht aan te geven op basis van welke informatie aangetoond kan worden dat een nakomeling van een kruising tussen twee planten een hybride van deze ouders is.

Om aan te tonen dat een nakomeling van een kruising een hybride tussen twee planten is, kunnen verschillende analyses worden uitgevoerd. Door het aantonen van moleculaire merkers van beide ouders in de nakomeling kan volgens de COGEM overtuigend bewezen worden dat de nakomeling een hybride is van de twee ouderplanten. De COGEM is van mening dat het fenotype van de nakomeling van een kruising tussen twee planten sterke aanwijzingen kan geven dat de nakomeling een hybride is tussen de twee ouders. Bij zowel moleculaire als fenotypische analyse acht de COGEM het noodzakelijk dat meerdere kenmerken van beide ouders in de nakomeling zijn aangetoond, om de kans op fout-positieven en fout-negatieven uit te sluiten dan wel te verkleinen.

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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

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

c.c. Drs. H.P. de Wijs
Dr. I. van der Leij

Bewijsvoering voor het aantonen van een hybride na kruising van verwante plantensoorten

COGEM advies CGM/100225-02

Inleiding

Planten die zijn vervaardigd met behulp van celfusie of protoplastfusie worden aangemerkt als genetisch gemodificeerd organisme (ggo). Deze planten moeten voldoen aan Europese regelgeving voor ggo's, beschreven in Richtlijn 2001/18/EG.¹ De Europese Richtlijn 2001/18/EG is in de Nederlandse wetgeving vastgelegd in het Besluit ggo.² In de ggo-regelgeving is een clausule opgenomen over vrijstellingen van de regelgeving bij doelbewuste introductie in het milieu.^{3,4} Planten vervaardigd met cel- en protoplastfusie kunnen volgens deze clausule uitgezonderd worden van de regelgeving, indien de twee ouderplanten kunnen kruisen met behulp van conventionele veredelingsmethoden. Bij celfusie wordt genetisch materiaal gecombineerd op dezelfde wijze als via conventionele veredelingsmethoden. Hierbij wordt de voorwaarde gesteld dat er bij de celfusie geen gebruik wordt gemaakt van recombinant DNA of ggo's.

Celfusie en kruisingen hebben beide tot doel waardevolle eigenschappen van de ouderplanten samen te brengen in één plant, de hybride. Kruisingen komen van nature tussen verwante plantensoorten voor. Veredelaars kunnen met behulp van conventionele veredelingsmethoden, zoals haploïdisatie, voorbehandeling van mannelijke of vrouwelijke bloeddelen en *in vitro* cultuur van embryo's of vruchtbeginsels, soorten met elkaar kruisen waarvan het minder waarschijnlijk is dat zij in de natuur met elkaar zullen kruisen. Gentechnologie gaat nog een stapje verder en kan hybrides mogelijk maken tussen plantensoorten die verder van elkaar af staan.

Adviesvraag

Het ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer ontvangt aanvragen van veredelingsbedrijven om celfusie-producten uit te zonderen van de ggo-regelgeving. Veredelaars overhandigen gegevens die laten zien dat kruising tussen gefuseerde planten mogelijk is. Deze aanvragen worden op een case-by-case basis beoordeeld. Van de mogelijkheid tot uitsluiting van celfusie van ggo-regelgeving is in de afgelopen jaren met enige regelmaat gebruik gemaakt. Het ministerie van VROM heeft met betrekking tot de aanvragen advies gevraagd aan de COGEM. De vraag hierbij is, op basis van welke informatie aangetoond kan worden dat een nakomeling van een kruising tussen twee planten een hybride van deze ouders is.

Eerder advies

In 1995 heeft de COGEM geadviseerd over celfusie van cichorei (*Cichorium intybus*), andijvie (*Cichorium endivia*) en ijsbergsla (*Lactuca sativa*) met zonnebloem (*Helianthus annuus*). Deze plantensoorten behoren allen tot de familie van de composieten, de *Asteraceae*. In 1995 werd herziening van de Richtlijnen 90/219/EEG en 90/220/EEG besproken en was op dat moment

voorgesteld om celfusie tussen plantensoorten uit dezelfde botanische familie uit te sluiten van de ggo-regelgeving. De COGEM ondersteunde dit voorstel en voorzag geen risico's verbonden aan de celfusieproducten, ten opzichte van de normale veredelingspraktijk. Aangezien cichorei, andijvie, ijsbergsla en zonnebloem tot dezelfde familie behoren, werd geadviseerd de celfusie tussen deze soorten vrij te stellen van inschaling als ggo. In de uiteindelijke herziening van de Richtlijnen is de voorwaarde dat plantensoorten uit dezelfde botanische familie moeten komen niet opgenomen. Daarvoor in de plaats is de in de inleiding genoemde voorwaarde, dat de plantensoorten moeten kunnen kruisen met behulp van conventionele verdelingsmethoden, gekomen.

Overweging en advies

Om te bevestigen dat een nakomeling van een kruising tussen twee planten een hybride is, moet de nakomeling worden geanalyseerd. De analyse kan zich onder andere richten op uiterlijk waarneembare kenmerken van de plant (het fenotype) of op de genetische samenstelling van de plant (het genotype). De kenmerken van de nakomeling moeten daarbij vergeleken worden met die van beide ouders. Als uit de analyse naar voren komt dat de nakomeling kenmerken heeft van beide ouders, kan geconcludeerd worden dat de nakomeling een resultaat is van de kruising.

Genotypische moleculaire karakterisatie is doorslaggevend

Het genotype van een nakomeling kan worden vergeleken met dat van de ouderplanten door te kijken naar moleculaire merkers in het DNA. Technieken die gebruiken maken van moleculaire merkers, bijvoorbeeld AFLP (amplified fragment length polymorphisms), SSR (simple sequence polymorphisms) of RAPD (random amplification of polymorphic DNA) zijn hiervoor geschikt. Ook is het mogelijk DNA sequenties van de ouders en de nakomeling te vergelijken.

Aan de hand van een beschrijving van het experiment en weergave van de resultaten van de experimenten kan worden nagegaan of de nakomeling DNA van beide ouderplanten heeft ontvangen. Door het aantonen van moleculaire merkers van beide ouders in de nakomeling kan volgens de COGEM overtuigend bewezen worden dat de nakomeling een hybride is van de twee ouderplanten. Om de kans op zowel fout-positieven als fout-negatieven, die om proef-technische redenen of door mutaties of deleties kunnen optreden, uit te sluiten, acht de COGEM het nodig dat er meerdere merkers van beide ouders in de nakomeling aan worden getoond.

Ondersteunend bewijs

Om het fenotype van een plant te analyseren, kan bijvoorbeeld gekeken worden naar kenmerken in de bouw van de plant of de reactie op externe stimuli. Aan de hand van een beschrijving en de resultaten van een experiment of een foto van een uiterlijk kenmerk, kan worden nagegaan of de nakomeling kenmerken heeft van beide ouders.

De COGEM is van mening dat fenotypische analyse sterke aanwijzingen kan geven dat een nakomeling van een kruising een hybride is van beide ouderplanten. Hierbij acht de COGEM het noodzakelijk dat meerdere fenotypische kenmerken zijn geanalyseerd, om de kans op fout-positieven en fout-negatieven te verkleinen. Een voorbeeld hiervan is de overerving van

recessieve fenotypische kenmerken, waarbij niet met zekerheid uitgesloten kan worden dat er zelfbestuiving heeft plaatsgevonden. Mutaties of deleties kunnen tot fout-negatieven leiden.

Overigens is het van belang dat de geleverde informatie compleet en kwalitatief goed is. Scherpe foto's, en foto's van zowel de volledige planten als van specifieke fenotypische kenmerken, zullen de overweging vergemakkelijken.

Een regelmatig gebruikte methode om hybriden te onderscheiden van hun oudersoorten is flowcytometrie, waarmee de hoeveelheid DNA in cellen bepaald wordt. Deze methode maakt gebruik van het verschil in de hoeveelheid DNA tussen de ouders. De hoeveelheid DNA van een hybride ligt in de regel precies tussen die van de ouderplanten. Indien het fenotype geen uitsluitsel geeft tot welke soort een plant behoort, kan een flowcytometrische analyse de doorslag geven. Echter, voorkennis van het verschil tussen de hoeveelheid DNA van beide ouders is hiervoor nodig. Ook kan de hoeveelheid DNA, en daarmee de grootte van of het aantal chromosomen, binnen een soort sterk verschillen. Naar de mening van de COGEM kan flowcytometrische analyse op zichzelf geen sluitend bewijs geven dat een plant een hybride tussen twee bepaalde soorten is.

Conclusie en advies

De COGEM is van mening dat zowel fenotypische als genotypische analyse sterke aanwijzingen kunnen geven dat een nakomeling van een kruising een hybride is van twee ouderplanten. Door het aantonen van moleculaire merkers van beide ouders in de nakomeling kan volgens de COGEM overtuigend bewezen worden dat de nakomeling een hybride is van de twee ouderplanten.

Additionele opmerking

Volgens de Richtlijn 2001/18/EG en het Besluit ggo kunnen ggo's die met cel- of protoplastfusie zijn vervaardigd, uitgezonderd worden van de ggo-regelgeving. De voorwaarde hiervoor is dat de ouderplanten kruisbaar zijn met behulp van conventionele veredelingsmethoden. Opgemerkt moet worden dat de term 'conventionele verdelingsmethode' geen vaststaande definitie heeft. Wat verstaan wordt onder conventionele verdelingsmethoden verandert met de voortschrijding van de wetenschap en de tijd. In de toekomst kunnen de grenzen van kruisbaarheid door nieuwe en/of verbeterde verdelingsstechnieken opgerekt worden. In het bovenstaande advies gaat de COGEM niet in op de implicaties van de vervaging van de grenzen van de kruisbaarheid voor de ggo-regelgeving. De COGEM beperkt zich tot de adviesvraag over het aantonen van een hybride tussen twee plantensoorten.

Referenties

1. Richtlijn 2001/18/EG van het Europees parlement en de raad inzake de doelbewuste introductie van genetisch gemodificeerde organismen in het milieu en tot intrekking van Richtlijn 90/220/EEG van de Raad

2. Besluit genetisch gemodificeerde organismen Wet milieugevaarlijke stoffen: Besluit van 25 januari 1990, tot vaststelling van een algemene maatregel van bestuur krachtens artikel 24 van de Wet milieugevaarlijke stoffen
3. Artikel 3, Annex IB, 2^e lid van Richtlijn 2001/18/EG
4. Bijlage 1 behorende bij artikel 23, 2^e lid, onder b van Besluit ggo