



COMMISSIE
COGEM
GENETISCHE
MODIFICATIE

BEZOEKADRES:
A. VAN LEEUWENHOEKLAAN 9
3721 MA BILTHOVEN

POSTADRES:
POSTBUS 578
3720 AN BILTHOVEN

TEL.: 030 274 2777
FAX: 030 274 4476
INFO@COGEM.NET
WWW.COGEM.NET

Aan de minister van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
Mevrouw dr. J.M. Cramer
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 01 november 2007
KENMERK CGM/071101-05
ONDERWERP Advies herindiening veldproef aardappel met verlaagd amylosegehalte

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag over de ontwerpbeschikking IM 07-006 en de vergunningaanvraag, getiteld 'Application for the release into the environment of potatoes with altered starch composition (II) according to the Genetically Modified Organisms Decree', van BASF Plant Science, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de milieurisico's van kleinschalige (klasse één) veldproeven met genetisch gemodificeerde aardappelen (*Solanum tuberosum*) met een verlaagd amylosegehalte. Het doel van de voorgenomen werkzaamheden is het bestuderen van het zetmeelgehalte en de zetmeelsamenstelling in knollen onder veldomstandigheden.

Aardappel kan in Nederland niet uitkruisen naar wilde verwanten. Aardappel kan wel in beperkte mate uitkruisen naar andere cultuurrassen. Uit experimenten is gebleken dat een verlaagd amylosegehalte geen effect heeft op de vorstgevoeligheid van aardappelen. De knollen zijn vorstgevoelig en zullen de Nederlandse winter gewoonlijk niet overleven. In de noodzaak om eventuele aardappelopslag uit zaad of achtergebleven knollen te verwijderen wordt in het kader van de verplichte bestrijding van *Phytophthora infestans* voorzien. De COGEM is verder van mening dat aan alle criteria die gesteld worden aan een klasse één experiment wordt voldaan.

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, consisting of a large loop followed by a horizontal stroke and a small dash.

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

c.c. Dr. D.C.M. Glandorf
Dr. I. van der Leij

Kleinschalige veldproef met genetisch gemodificeerde aardappelplanten met een verlaagd amylosegehalte

COGEM advies CGM/071101-05

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de milieurisico's van kleinschalige veldproeven met genetisch gemodificeerde aardappelen (*Solanum tuberosum*). BASF Plant Science is voornemens aardappelplanten met een veranderde zetmeelsamenstelling in de knollen te bestuderen en heeft hiertoe een aanvraag (IM 07-006) ingediend. Daarnaast heeft BASF een veldproefaanvraag ingediend voor aardappelen met een verhoogde ziekteresistentie tegen *Phytophthora infestans* (IM 07-007).

De onderhavige vergunningaanvraag heeft betrekking op kleinschalige werkzaamheden (klasse één) met genetisch gemodificeerde aardappelplanten in de gemeente Borger-Odoorn en Lingewaard.

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 dankzij dit zuivere amylopectinezetmeel er bij de verwerking voor hoogwaardige toepassingen minder energie en chemische hulpstoffen nodig zijn.

De vergunningaanvraag betreft aardappelplanten, waarin het *kgz* gen, dat codeert voor een korrelgebonden zetmeelsynthase (KGZ), is ingebracht. Het *kgz* gen is op één vector in 'antisense' oriëntatie ingebracht en in de andere vector als een 'inverted repeat' structuur. Dit resulteert in onderdrukking van de expressie van het in de plant aanwezige *kgz* gen hetgeen een verlaging van het amylosegehalte en daarmee tegelijkertijd een verhoging van het amylopectinegehalte in knollen tot gevolg heeft.

Geschiedenis dossier

De COGEM heeft in 2005 positief geadviseerd over de voorliggende aanvraag (1). Vervolgens is er door het ministerie van VROM een vergunning afgegeven voor de desbetreffende experimenten. Deze vergunning is echter door de Raad van State vernietigd op grond van procedurele overwegingen. BASF Plant Science heeft naar aanleiding hiervan opnieuw een vergunningaanvraag ingediend voor veldproeven met deze aardappelplanten.

Milieurisicoanalyse

Bij de risicobeoordeling van de 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 de introductie in het milieu wordt door de COGEM de staande landbouw en de klassieke veredeling als "baseline" voor genetische gemodificeerde gewassen gebruikt (2).

De uitgangspunten en de methodiek van de milieurisicobeoordeling is in de EU richtlijn 2001/18/EG 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 algehele risico van het ggo.

Bij de voorliggende aanvraag kijkt de COGEM naar de risico's voor mens en milieu die verbonden zijn aan de introductie in het milieu van genetische gemodificeerde aardappelplanten met een verlaagd amylosegehalte. Zowel directe als indirecte effecten worden beoordeeld. Hierbij is de kans op verspreiding door pollen of zaden, het eventueel uitkruisen van aardappel 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 indien verspreiding van de ingebrachte genen in het milieu zou optreden. 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. Een eiwit kan 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.

De COGEM heeft eerder richtlijnen opgesteld voor de beoordeling van veldproefaanvragen met genetisch gemodificeerde planten (3). In deze richtlijnen worden criteria beschreven voor een klassenindeling 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 één veldexperiment. Dit houdt in dat de jaarlijkse maximale omvang van de proef vijf hectare bedraagt op vijf locaties, waarbij elke locatie niet groter mag zijn dan één hectare.

Eventuele effecten moeten bij een klasse één experiment beperkt blijven tot het proefobject.

Eigenschappen van het gewas

De aardappelplant (*S. 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 (4). *S. tuberosum* is onderverdeeld in twee ondersoorten: *tuberosum* en *andigena*. De ondersoort *tuberosum* wordt in Europa geteeld. De aardappel komt in de Nederlandse flora niet voor, wel heeft zij wilde verwanten: de zwarte nachtschade, (*S. nigrum* subsp. *nigrum*), de beklierde nachtschade (*S. nigrum* subsp. *schultesii*), bitterzoet (*S. dulcamara*), glansbes nachtschade (*S. physalifolium*) en driebloemige nachtschade (*S. triflorum*) (5). Uitkruising met in Nederland voorkomende wilde verwanten van de aardappel is niet mogelijk (6). In Europa zijn geen levensvatbare hybriden gevonden in natuurlijke systemen (9). In Nederland vormt aardappel een belangrijk akkerbouwgewas, waarbij de geteelde variëteiten zijn onder te verdelen in consumptieaardappels en zetmeelaardappels. De laatste categorie wordt met name in noordoost Nederland geteeld.

Aardappel kent de volgende structuren voor verspreiding en overleving: pollen, zaden en knollen. In haar natuurlijke ecosysteem en in de meeste ecosystemen waarin de aardappel als cultuurgewas wordt toegepast, vindt vrijwel altijd knolvorming en in de meeste gevallen ook bloei plaats. In Nederland wordt de aardappel vegetatief vermeerderd. Aardappelknollen zijn koudegevoelig en overleven de winter in Nederland gewoonlijk niet. Alleen tijdens zachte winters zijn de aardappelknollen in staat te overleven en het volgende jaar uit te lopen (6).

De pollenkorrels van aardappel zijn relatief zwaar en worden verspreid via wind en insecten. Zowel kruis- als zelfbevruchting komt voor bij aardappel al vindt er hoofdzakelijk zelfbestuiving plaats (80-100%) (8). Uitkruising naar andere gecultiveerde aardappellrassen is in beperkte mate mogelijk maar neemt sterk af naarmate de afstand toeneemt; op 1 m 24% en op 10 m nog 0.02% uitkruising (6,7). Uitkruising vormt bovendien geen milieurisico mits eventuele aardappelopslag routinematig wordt verwijderd zoals vastgelegd in de "Verordening Hoofdproductschap Akkerbouw bestrijding *Phytophthora infestans* bij aardappelen 2003"(9).

Het loof van de aardappelen, inclusief de bloeiwijzen, met eventuele zaden wordt gewoonlijk voor de oogst afgedood en wordt verder niet benut. Er is aangetoond dat op een perceel zaden kunnen achterblijven die levensvatbaar zijn (10,11). Op basis van de ervaringen in de gangbare praktijk wordt verwacht dat een deel van deze zaden in staat is om de winter te overleven en te kiemen. Aardappelzaden worden niet door vogels verspreid. De zaden die eventueel worden gevormd door cultuuraardappelen zijn niet van agronomische betekenis, omdat bij de vermeerdering pootaardappelen worden gebruikt in plaats van zaden. Ook worden de eventuele zaden niet benut voor andere toepassingen.

Moleculaire karakterisering

De aardappelplanten zijn genetisch gemodificeerd met behulp van *Agrobacterium tumefaciens*, waarbij gebruik is gemaakt van twee vectoren: pAP2 of pAP4. Beide vectoren zijn afgeleid van pPZP200 en op beide vectoren liggen de volgende genen:

- een knolspecifieke promotor van het *kgz* gen, afkomstig uit *S. tuberosum*;
- *kgz* cDNA afkomstig uit *S. tuberosum* en coderend voor een korrelgebonden zetmeelsynthase. Het *kgz* cDNA is op vector pAP2 in “antisense” configuratie gekloneerd en op de vector pAP4 in een “inverted repeat” configuratie gekloneerd om *kgz* expressie uit te kunnen schakelen;
- *Tnos*, de terminator van het nopalinesynthasegen uit *A. tumefaciens*;
- *Pnos*, constitutieve promotor, afkomstig van *A. tumefaciens*;
- *ahas* gen, coderend voor acetohydroxyzuur synthase, afkomstig van *Arabidopsis thaliana*;
- *OCS*, terminator van het octopine synthase gen afkomstig van *A. tumefaciens* in pAP2 en *Tnos*, de terminator van het nopalinesynthasegen uit *A. tumefaciens* in pAP4.

Beide vectoren die gebruikt zijn voor de genetische modificatie bevatten 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 en zal niet in het genoom van planten worden ingebouwd. Naast de bovengenoemde genen

bevat pAP2 en pAP4 enkele regulatoire sequenties. Alleen planten waarvan aangetoond is dat die geen vectorsequenties bevatten zullen in de veldexperimenten gebruikt worden.

Het *kgz* 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. De constructen zijn zodanig ontworpen dat transcriptie wel zal plaatsvinden maar, translatie (omzetting van RNA naar eiwit) van de gevormde transcripten waarschijnlijk niet zal plaatsvinden, als gevolg van de “antisense” en “inverted repeat” oriëntatie. Dit leidt tot interne hybridisatie van de RNA transcripten, waarbij secundaire structuren gevormd worden die translatie van die transcripten onmogelijk maakt (12,13). 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 (14, 15, 16).

De genetisch gemodificeerde aardappelplanten 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 waardoor 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 (17). Deze verworven resistentie is gebruikt als selectiesysteem voor de aardappeltransformaties.

Overweging en Advies

Overweging van mogelijke risico's van het genetisch gemodificeerde gewas

Aardappel kan in Nederland niet uitkruisen met wilde verwanten, maar wel in beperkte mate en enkel over kleine afstanden met andere gecultiveerde aardappelrassen (6).

Opslagplanten kunnen ontstaan uit levensvatbare knollen dan wel uit zaden die zijn achtergebleven op het perceel of in de directe omgeving. Aardappelopslag uit knollen onderscheid zich van opslag uit zaad. Aan opslag uit zaad zitten cotylen, terwijl die niet zitten aan opslag uit knollen. Opslag uit zaad heeft in de normale landbouwkundige praktijk een lage concurrentiekracht t.ov. andere gewassen (21). Aardappelzaad is bovendien niet van agronomische betekenis omdat aardappels in Nederland vegetatief worden vermeerderd.

Eerdere experimenten hebben uitgewezen dat een verlaagd amylosegehalte niet van invloed is op de vorstgevoeligheid van aardappelknollen (18). De COGEM heeft in 1995 naar aanleiding van deze resultaten een advies afgegeven (19) waarin gesteld wordt dat de conclusie zich uitstrekt tot alle genetisch gemodificeerde aardappelen met een verlaagd amylosegehalte, ongeacht het uitgangsras waar de genetisch gemodificeerde aardappelen van afgeleid zijn. De COGEM heeft haar mening bevestigd in een later advies (20) in het kader van een wijzigingsverzoek (van BGGO 95/05) voor opschaling tot grootschalige teelt van de rassen Apropos en Apriori, waarvan de zetmeelsamenstelling veranderd was. Achtergebleven aardappelknollen zijn koudegevoelig en kunnen alleen tijdens zachte winters overleven en het volgende jaar uitlopen (6).

Daarnaast wordt in het kader van de verplichte bestrijding van de aardappelziekte, zoals is vastgelegd in de "Verordening Hoofdproductschap Akkerbouw bestrijding *Phytophthora infestans* bij aardappelen 2003", eventuele aardappelopslag routinematig verwijderd. Controle op uitvoering van de opslagbestrijding wordt uitgevoerd door NAK AGRO. In de praktijk blijkt dat aardappelopslag doelmatig bestreden wordt.

Aardappel kan zich in Nederland niet handhaven. Verwildering, het proces waarbij zich vanuit cultuurpopulaties beklijvende wilde populaties ontwikkelen, is in Nederland dan ook niet waargenomen bij aardappel.

Overweging van mogelijke risico's van de ingebrachte genen

De aardappelplanten zijn genetisch gemodificeerd met behulp van het plasmide pAP2 of het plasmide pAP4, die beide afgeleid zijn van de vector pPZP200. Op beide vectoren zijn fragmenten van het *kgz* cDNA gebruikt voor een 'antisense' construct en een 'inverted repeat' construct. De genetisch gemodificeerde aardappelplanten bevatten tevens een gemuteerd *ahas* gen, waardoor tolerantie voor het herbicide Imazamox is verkregen (17). De COGEM merkt hierbij op dat deze herbicidenresistentie niet van agronomische betekenis is omdat de toepassing van Imazamox in Nederland verboden is.

Daarnaast zijn het antibioticumresistentiegen *aadA* en nog enkele regulatoire sequenties aanwezig op de 'vectorbackbone'. De aanvrager zal alvorens de genetisch gemodificeerde aardappelplanten in het veld worden gezet gegevens aanleveren waaruit blijkt dat het *aadA* gen en andere op de 'vectorbackbone' gelegen sequenties niet aanwezig zijn in de genetisch gemodificeerde aardappelplanten. De COGEM is van mening dat aan alle criteria voor de beschrijving van de constructen zoals die vereist zijn voor een klasse één experiment, wordt voldaan.

Advies

Het onderhavige advies heeft betrekking op een vergunningaanvraag voor veldexperimenten met genetisch gemodificeerde aardappelen met verlaagd amylosegehalte. Er zijn geen redenen te veronderstellen dat de verlaging van het amylosegehalte in aardappelknollen zal leiden tot verwildering. Uit experimenten is gebleken dat een verlaagd amylosegehalte geen effect heeft op de vorstgevoeligheid van de aardappelen. De knollen zijn vorstgevoelig en zullen de Nederlandse winter gewoonlijk niet overleven. Alleen tijdens zachte winters zijn de aardappelknollen in staat te overleven en het volgende jaar uit te lopen. De genetisch gemodificeerde aardappel kan in Nederland niet uitkruisen naar wilde verwanten. De aardappel kan wel uitkruisen naar andere cultuurrassen, maar slechts in beperkte mate en enkel over korte afstanden. De isolatiezone van twintig meter zoals door de aanvrager wordt gehanteerd, is voldoende om uitkruising naar cultuurverwanten te voorkomen. De vector is voor een klasse één experiment voldoende gekarakteriseerd. Bovendien zal eventuele opslag uit zaad of achtergebleven knollen worden bestreden in het kader van de verplichte bestrijding van *Phytophthora infestans*. In de praktijk blijkt dat aardappelopslag daarmee effectief bestreden wordt.

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

Referenties

1. COGEM (2005) Kleinschalige veldproef met genetisch gemodificeerde aardappelplanten met een verlaagd amylosegehalte (CGM/051206-03)
2. COGEM (2002). Staande landbouw en klassieke veredeling als referentiekader (CGM/021017-06)
3. COGEM (2005). Indeling veldwerkzaamheden met genetisch gemodificeerde planten (CGM/050929-03)
4. Tutin TB, Burges NA, Chater AO, Edmondson JR, *et al.* (1972). Flora Europaea: Diapensiaceae to Myoporaceae. Cambridge University Press, Cambridge
5. Van der Meijden, R. (2005). Heukels' flora van Nederland, 23^e druk, Wolters-Noordhoff, Groningen
6. OECD. (1997). Consensus Document on the Biology of *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* (Potato) No. 8
7. McPartlan, H. Dale, P. (1994) An assessment of gene transfer by pollen from field-grown transgenic potatoes to non-transgenic potatoes and related species. Transgenic research 3, 216-225
8. Plaisted RL (1980). Potato. In: Fehr WR & Hadley HH (Eds). Hybridization of crop plants. Am. Soc. Agr. Wisconsin. USA

9. De Vries, FT, van der Meijden R, Brandenburg, WA. (1992) *Gorteria*, Botanical Files. A study of the real chances for spontaneous gene flow from cultivated plants to the wild flora of the Netherlands. Supplement 1
10. Lawson HM (1983). True potato seeds as arable weeds. *Potato Research* 26: 237-246
11. Love S, and Pavek J. (1994). Ecological Risk of growing transgenic potatoes in the United States and Canada: potential for vegetative escape or gene introgression into indigenous species. *American Potato Journal* 71: 647-658
12. Wesley, SV, Helliwell CA, Smith, NA, *et al.* (2001). Construct design for efficient and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal* Vol. 27, pp. 581-590
13. Muskens, MWM, Vissers APA, Mol, JNM, Kooter JM. (2000) Role of inverted DNA repeats in transcriptional and post-transcriptional gene silencing. *Plant Molecular Biology* Vol. 43, pp. 243-260
14. Yu, H, Kumar PP. (2003). Post-transcriptional gene silencing in plants by RNA. *Plant Cell Reports* 22: 167-174
15. Wassenegger M, and Pélissier T. (1998). A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. *Plant Molecular Biology* 37: 349-362
16. Matzke M, Matzke, AJM and Kooter JM (2001). RNA: Guiding gene silencing. *Science* 293: 1080-1083
17. Andersson, M, Trifonova, A, Andersson, AB, *et al.* (2003). A novel selection system for potato transformation using a mutated AHAS gene. *Plant Cell Rep* 22: 261-267
18. Karna. (1994). Verslag in het kader van vergunning BGGO 93/14, d.d. 22 december 1994, kenmerk WMS9415/ph
19. COGEM (1995). Vorstgevoeligheid amylose-vrije aardappelen (CGM/950203-07)
20. COGEM (1999). Advies BGGO 95/05 (verlenging) (CGM/990112-01)
21. Wiel, C van de, B Lotz (2004) Inventarisatie van de wetenschappelijke kennis over uitkruising in maïs, koolzaad, aardappel en suikerbiet voor het coëxistentieoverleg 2004. *Plant Research International Nota* 322, Wageningen