

De biologische veiligheid van genetisch gemodificeerde organismen in de natuur

Een zwaartepunt in het DLO-onderzoek

De biologische veiligheid van genetisch gemodificeerde organismen in de natuur

Een zwaartepunt in het DLO-onderzoek

100-226802

Dr J.A. van Veen IB-DLO

met bijdragen van:

Dr W.J. Stiekema CPRO-DLO

Dr T.G. Kimman CDI-DLO

Dr Ir J.D. van Elsas IB-DLO

**Dienst Landbouwkundig Onderzoek
Wageningen, september 1991**

Colofon:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek
Postbus 59
6700 AB Wageningen
tel. 08370-74000

Inhoudsopgave

	pag
1 Inleiding	7
2 De biologische veiligheid van transgene gewassen	9
2.1 Factoren die de biologische veiligheid van transgene gewassen bepalen	9
2.1.1 Aard van het gewas	9
2.1.2 Aard van de transgene eigenschap	12
2.2 Bijdrage van DLO aan het onderzoek	14
2.3 Noodzaak tot verder onderzoek	15
3 Biologische veiligheid bij het gebruik van genetisch gemodificeerde micro-organismen in de bodem	19
3.1 Factoren die de biologische veiligheid van genetisch gemodifi- ceerde micro-organismen, GGM's, in de bodem bepalen	20
3.1.1 Vestiging, overleving en groei van geïntroduceerde micro- organismen (met name bacteriën)	20
3.1.2 Transport van geïntroduceerde micro-organismen	21
3.1.3 Horizontale genoverdracht door geïntroduceerde micro- organismen	22
3.1.4 Invloed van bodem factoren op de selectie van het hetero- loge gen	22
3.2 Bijdrage van DLO aan het onderzoek	23
3.3 Noodzaak tot verder onderzoek	24
4 Biologische veiligheid bij het gebruik van genetisch gemodificeerde vaccins	27
4.1 Factoren die de biologische veiligheid van genetisch gemodifi- ceerde vaccins bepalen	27
4.2 Bijdrage van DLO aan het onderzoek	28
4.3 Noodzaak voor verder onderzoek	29
5 Samenvatting	31

1 Inleiding

Het beschikbaar komen van recombinant DNA-technieken en de sterk verbeterde kennis van de moleculaire genetica van organismen brengen potentieel zeer waardevolle toepassingen, ook in de landbouw en het natuur- en milieubeheer, binnen handbereik.

Door het aanbrengen van specifieke genetische modificaties in planten, dieren en micro-organismen, over natuurlijke barrières heen, worden mogelijkheden geschapen om de kwaliteit van vele land- en tuinbouwgewassen te verbeteren, het gebruik van pesticiden te verminderen, chemicaliën uit het milieu te verwijderen dan wel nieuwe vaccins te ontwikkelen.

De meeste van deze potentiële toepassingen bevinden zich nog in een ontwikkelingsstadium. Vele vragen op het gebied van de genetica, de fysiologie en de ecologie dienen nog te worden beantwoord, voordat van een grootschalig gebruik van transgene organismen in de landbouw en het milieubeheer sprake zal zijn.

De discussie over de biologische veiligheid van genetisch gemodificeerde organismen komt dan ook vroeg, maar zeker niet te vroeg. De lessen van het verleden over het schier ongebreidelde ge- en misbruik van chemicaliën in de landbouw en elders hebben geleerd voorzichtig om te gaan met de introductie van nieuwe methodologieën in de natuur.

Elke toepassing van transgene organismen in de natuur roept eigen specifieke vragen op ten aanzien van de biologische veiligheid. Echter aan geen enkele toepassing kan een certificaat van absolute veiligheid worden verleend, zoals dat overigens geldt voor de meeste technologieën. Derhalve zal op basis van zoveel mogelijk informatie een verantwoorde afweging van risico en (economisch) nut gemaakt moeten worden. Dit houdt tevens in, dat het nut, d.w.z. de effectiviteit van het gebruik van genetisch gemodificeerde organismen, zodanig is, dat men bereid is eventueel (kleine) risico's te aanvaarden. Dit heeft consequenties voor de aard van het onderzoek. Onderzoek naar de biologische veiligheid is namelijk slechts relevant, indien het in nauwe relatie met onderzoek naar de effectiviteit van het gebruik van genetisch gemodificeerde organismen wordt uitgevoerd. Het grote belang, dat de moderne biotechnologie kan betekenen voor de landbouw en het natuur- en milieubeheer, heeft zijn weerslag gevonden in de aanzienlijke inzet in personeel en middelen binnen de Dienst Landbouwkundig Onderzoek, DLO, in het biotechnologisch onderzoek. Overeenkomstig daarmee is de relatief grote inspanning van DLO-instituten op het terrein van de biologische veiligheid van het gebruik van genetisch gemodificeerde organismen in de natuur.

Laatst genoemd type onderzoek is hier beschreven, in relatie tot de standvan-zaken ten aanzien van de kennis over de biologische veiligheid van genetisch gemodificeerde planten, micro-organismen en vaccins. Voorts is aangegeven waar nog lacunes zijn in onze kennis waarvoor nader onderzoek noodzakelijk is.

Voor risico-assessment onderzoek bij gerecombineerde landbouwhuisdieren wordt vooralsnog geen extra aandacht noodzakelijk geacht, gezien de gemakkelijk in te schatten en in te perken risico's. Hier liggen de vragen veeleer op het vlak van de ethiek. Derhalve wordt hieraan in dit rapport geen aandacht geschonken.

2 De biologische veiligheid van transgene gewassen

De recombinant-DNA-technologie heeft het mogelijk gemaakt erfelijke eigenschappen uit virussen, bacteriën, schimmels, plant, dier en mens naar cultuurgewassen over te dragen.

Dit heeft tot nu toe geleid tot virus-, bacterie-, insecte- en herbicideresistente gewassen alsook tot nieuwe bloemkleuren, andere zetmeelsamenstelling, andere afrijpingskarakteristieken en een nieuwe vorm van mannelijke steriliteit.

Op dit moment, nog geen 8 jaar na de isolatie van de eerste transgene tabaksplant, vinden veldproeven met transgene gewassen in diverse landen, ook in Nederland, volop plaats. Dit illustreert de snelle implementatie van deze nieuwe methoden voor de plantenveredeling. Deze nieuwe technologie kan onder meer een bijdrage leveren aan de terugdringing van de milieubelasting met landbouwchemicaliën via inbouw van resistenties tegen fytopathogenen en plagen in cultuurgewassen. Ook zijn er goede perspectieven voor de verbetering van de kwaliteit en de agrificatie van land- en tuinbouwgewassen.

Ondanks deze aantrekkelijke perspectieven moet niet uit het oog worden verloren dat hier sprake is van een nieuwe technologie. De consequenties voor het milieu van grootschalig gebruik van transgene gewassen, met een breed scala van transgene eigenschappen, kan nog niet altijd goed worden ingeschat. Kennis betreffende de biologische veiligheid van transgene gewassen is dan ook gewenst.

2.1 Factoren die de biologische veiligheid van transgene gewassen bepalen

Bij de vaststelling van de eventuele risico's bij het in het milieu brengen van transgene gewassen, dus bij de inschatting van de biologische veiligheid van transgene gewassen, speelt de aard van het gewas naast de aard van de transgene eigenschap een belangrijke rol.

2.1.1 Aard van het gewas

De vragen, die van belang zijn bij de vaststelling van de biologische veiligheid van een transgene plant, kunnen onderverdeeld worden in vier categorieën:

Kan het nageslacht van de transgene plant een plaag worden?

Deze vraag zal in de meeste gevallen negatief beantwoord kunnen worden. Cultuurplanten zijn via veredeling aangepast aan menselijke doelein-

den en teeltmethoden en zullen zich diensgevolge veelal niet kunnen handhaven in het milieu. Voorbeelden hiervan zijn maïs, granen en aardappel. Tevens zijn er goede aanwijzingen, dat ook koolzaad en peen buiten de akker uitsluitend in onnatuurlijke ecosystemen worden aangetroffen. Een uitzondering moet gemaakt worden voor die cultuurplanten die nog maar een geringe mate van domesticatie hebben doorgemaakt of erg competitief zijn, zoals grassen. Introductie van transgene grassen in het milieu kan leiden tot verspreiding van de transgene planten in de natuurlijke grassenpopulatie in Europa. Indien de aard van de transgene eigenschappen daar aanleiding toe geeft, is biologische inperking van transgene grassen, bijv. via mannelijke steriliteit, dan ook aan te bevelen. In dit kader kan gedacht worden aan stapeling van transgenen die de verspreiding of overleving van grassen drastisch beïnvloeden, zoals stapeling van resistenties tegen fytopathogenen.

Kan het transgen worden overgedragen van de cultuurplant naar een wilde verwant en kan de hybride een plaag worden?

Deze vraag richt zich op het vaststellen van mogelijke overdracht van transgenen naar wilde verwanten van de cultuurplant via kruising en overleving van de hybride. De verwant moet in dit geval gelijktijdig bloeien met én in de nabijheid voorkomen van het transgene gewas i.v.m. stuifmeeloverdracht.

Petunia, chrysantheum en komkommer hebben geen wilde verwanten in Europa. Verspreiding van transgenen kan vanuit deze gewassen in Europa dan ook niet plaatsvinden. Anders is dit voor bijvoorbeeld aardappel, tomaat, koolzaad, biet en grassen. Wilde verwanten van deze cultuurplanten komen wel in Europa voor. In deze gevallen zal experimenteel nagegaan moeten worden of genoverdracht van de cultuurplant naar de voorkomende wilde verwanten werkelijk kan plaatsvinden. Voor aardappel en tomaat is door CPRO-DLO aangetoond dat uitkruising met zijn wilde verwanten in Nederland niet plaatsvindt. Daarentegen vindt bij biet, koolzaad en waarschijnlijk grassen wel uitkruising naar wilde verwanten plaats. Vaak zijn echter slechts summiere gegevens over de uitkruising bekend. Plantenveredelaars gebruiken wilde verwanten meestal als geniteur en niet als acceptor. Vandaar dat momenteel in Frankrijk nauwkeurig wordt vastgesteld met welke wilde verwanten koolzaad kan uitkruisen, in welke mate kruising plaatsvindt en hoe fertiel de hybriden zijn. Dit onderzoek zal op grotere schaal in 1991 onder veldomstandigheden worden voortgezet. In Engeland is een dergelijk onderzoek gaande met lucerne.

Indien genoverdracht naar de wilde flora mogelijk is, is het belangrijk de verspreidingsradius van de pollen van de cultuurplant vast te stellen. De mate van biologische inperking van een transgene plant kan door de bestuivingswijze sterk worden beïnvloed. Bij gewassen die door insecten worden bestoven (bijv. aardappel, koolzaad, erwt, siergewassen) zal de pollenverspreiding geringer zijn dan bij windbestuivers.

Bij koolzaad is recent via veldexperimenten vastgesteld dat slechts tot op een afstand van 40 meter van transgene koolzaadplanten, transgeen zaad op een niet-transgene ontvangerpopulatie was te detecteren. Inperking van transgeen koolzaad is dus mogelijk door te zorgen dat binnen een straal van tenminste 40 meter geen acceptor planten voor koolzaad voorkomen.

Bij windbestuivers moet onderscheid gemaakt worden tussen zelfbevruchters (tarwe en gerst) en kruisbevruchters (biet, rogge en grassen) aangezien bij zelfbevruchters pollenverspreiding zeer beperkt kan zijn (cleistogamie).

Tot nu toe zijn er geen gegevens beschikbaar over de verspreiding van pollen bij grassen.

De mate van verdere verspreiding van het transgen zal nauw samenhangen met de fertiliteit van de ontstane hybride. Bij koolzaad is inmiddels gebleken dat de fertiliteit van hybriden verkregen na uitkruising met verschillende wilde verwanten sterk kan variëren. In dit kader kan inventariserend biosystematisch onderzoek naar het voorkomen van wilde verwanten van cultuurgewassen nuttig zijn.

Indien een hybride is ontstaan moet vastgesteld worden of de hybride zich kan handhaven in de wilde populatie of zelfs een plaag kan worden.

Indien overdracht naar wilde verwanten plaatsvindt, de hybride fertiel is of zich vegetatief kan vermeerderen en zich kan handhaven in het milieu dan zal uiteindelijk de aard van het transgen(product) de doorslag moeten geven bij de vaststelling van de biologische veiligheid van het transgene gewas.

Kan het geïntroduceerde gen vanuit de cultuurplant terecht komen in een niet-verwant organisme en kan dit organisme een plaag worden?

Bij de overdracht van transgenen van planten naar andere organismen moet onderscheid gemaakt worden tussen verwante en niet-verwante organismen zoals bacteriën.

Overdracht van genetisch materiaal tussen niet-verwante organismen ofwel horizontale overdracht, zou plaats kunnen vinden via virussen, die ook bij planten veelvuldig voorkomen. Integratie van plantevirussen in het genoom van de plant komt echter niet voor hetgeen overdracht van genetisch materiaal via deze weg onmogelijk maakt.

Andere mechanismen van horizontale overdracht van genetisch materiaal vanuit de plant zijn niet bekend. Wel komen op het Ti-plasmide van de bodembacteriën *Agrobacterium tumefaciens* en *Agrobacterium rhizogenes* genen voor die inactief zijn in de bacterie maar actief na integratie in het plantengenoom. Het is echter niet aangetoond dat deze bacteriële genen oorspronkelijk afkomstig zijn uit het plantengenoom.

Voor horizontale overdracht, dus overdracht van genetisch materiaal van plantaardige oorsprong naar niet-verwante organismen zoals bacteriën, is tot nu toe geen enkele aanwijzing gevonden.

Kunnen de ecologische relaties van de transgene plant veranderen door de nieuw geïntroduceerde eigenschap(en)?

Het transgene genproduct zal in het algemeen aanwezig zijn in de plant of in onderdelen daarvan. Voor de vaststelling van de biologische veiligheid van een transgene plant betekent dit dat het effect van de consumptie van de plant op (on)bedoelde consumenten voor zover mogelijk moet worden vastgesteld. Afhankelijk van de aard van de transgene eigenschap zal dit vooraf moeten gaan aan veldexperimenten.

De transgene eigenschap zou ook een effect kunnen hebben op de samenstelling van exudaten van de plant. In die gevallen zal getest moeten worden of nuttige organismen (bv. bijen) schade ondervinden van deze veranderde exudaten.

2.1.2 Aard van de transgene eigenschap

In veel gevallen zal de biologische veiligheid van een transgeen gewas afhangen van de transgene eigenschap(en) die het bezit. De biologische veiligheid van een aantal transgene eigenschappen zal hier nader worden behandeld.

Antibiotica resistentie selectiegenen

De antibiotica kanamycine en hygromycine worden veelvuldig gebruikt bij de selectie van transgene planten. Er zijn geen aanwijzingen dat kanamycine en hygromycine in de bodem voorkomen en dus zullen planten die deze resistentie eigenschap bezitten geen competitief voordeel hebben ten opzichte van de wilde flora. De aanwezigheid van bacteriële antibiotica resistentiegenen in planten heeft dan ook geen effect op hun biologische veiligheid.

Door het gebruik van antibiotica tijdens de selectie is het mogelijk dat de concentratie antibiotica in het milieu toeneemt, wat kan bijdragen aan de opbouw van antibiotica resistentie bij bodem micro-organismen. Kwantificering van de toename van de uitstoot van antibiotica in het milieu door toepassing bij de isolatie van transgene gewassen is in dit verband dan ook nuttig.

Reporter genen als het glucuronidase gen

Bij veel moleculair biologisch onderzoek worden reporter genen als het *E.coli* glucuronidase gen gebruikt. Transgene gewassen zullen geen selectief voordeel van dergelijke bacteriële genen hebben. Bovendien zijn er tot nu toe geen neveneffecten van het glucuronidase genproduct op bijvoorbeeld het metabolisme van de plant gerapporteerd. De biologische veiligheid van de plant zal door dit transgen niet worden beïnvloed.

Herbicide resistentiegenen

Introductie van een herbicide resistentiegen in gewassen die uitkruisen met wilde flora of die zich kunnen verspreiden in het milieu zoals grassen, zal verspreiding van deze resistentie in het milieu veroorzaken. Hierdoor zal het herbicide onbruikbaar worden. Als het milieuvriendelijke herbiciden betreft is dit niet wenselijk.

Herbicide resistentiegenen kunnen ook gebruikt worden als selectiegen bij de selectie van hybridezaad. Het gebruik van een resistentiegen tegen een milieu-onvriendelijk herbicide verdient dan de voorkeur. Verspreiding van een dergelijke resistentie in het milieu zal immers leiden tot het onbruikbaar worden van het milieu-onvriendelijke herbicide.

Sommige herbicide resistenties zijn gebaseerd op modificatie van het herbicide in de plant. Indien het gemodificeerde product zich vervolgens opheeft in de plant zal een toxicologische studie noodzakelijk zijn.

Insecten resistentiegenen

Deze genen hebben een effect op de natuurlijke insecten- populatie. Transgene planten uitgerust met dergelijke genen zullen een competitief voordeel hebben. Dit geldt ook voor gewassen die via de kruisingsveredeling deze resistenties hebben verkregen. In het geval van uitkruising zal de wilde flora, voor zover die gereguleerd wordt door insectenvraat, be-

invloed worden. Het is daarom belangrijk het werkingsspectrum van de resistentie nauwkeurig vast te stellen. Een veel gebruikt insectenresistentiegen zorgt voor de productie van *Bacillus thuringiensis* toxines in transgene planten. Deze bacteriele toxines bezitten een grote specificiteit waardoor het effect op de insectenpopulatie niet groot zal zijn. Daarom zal de wilde flora die dit gen opneemt ook geen groot voordeel hebben tenzij het gaat om een wilde soort die alleen door een voor dit toxine gevoelig insect wordt gereguleerd in zijn verspreiding.

Daarnaast is het belangrijk vast te stellen dat *Bacillus thuringiensis* lysaten, met daarin bacteriele sporen, al veel gebruik worden voor insectenbestrijding via bespuiting. Deze resistentiegenen zijn dus niet nieuw voor de natuur. Bovendien zijn deze toxines niet toxisch voor de mens.

Insectenresistenties gebaseerd op proteïnase inhibitors (PI's) kunnen een grotere impact hebben op het ecosysteem daar ze een breedspectrum insecticide werking bezitten. Gewassen die dergelijke resistentiegenen bezitten zullen een competitief voordeel hebben. De aard van het gewas zal het uiteindelijke effect bepalen. Ditzelfde geldt voor hybriden na opname van het gen via kruising met wilde verwanten.

Naast voor mens en dier niet-toxische PI's (de aardappelknol bevat een groot aantal PI's) bestaan er ook PI's die wel toxisch zijn voor zoogdieren. Toxicologische studies van het transgene gewas zijn in dit geval noodzakelijk.

Virus resistentiegenen

Deze resistentie kan verkregen worden door introductie en expressie van onderdelen van het virusgenoom in de plant. Het meest succesvol is tot nu toe het virale manteleiwitgen. In het transgene gewas wordt het manteleiwit tot 0.1-1.0% van het bladeiwit opgehoopt. Dit betekent dus de introductie op grote schaal van viraal eiwit in het ecosysteem. Dit is geen unieke situatie. Bij een normale virale infectie worden veel hogere concentraties virale eiwitten in geïnfecteerde planten aangetroffen. Introductie in gewassen als grassen zal een ecologisch voordeel kunnen opleveren. Echter vaak zal introductie van deze resistentie geen effect sorteren daar soortgelijke resistenties al veelvuldig in de wilde flora voorkomen. Daarnaast zijn door kruising al vele virusresistenties in gewassen gebracht. Voor het ecosysteem is dit dus geen nieuwe situatie. Wel is het denkbaar dat een gewas dat constitutief een manteleiwit produceert een andere populatie organismen zal aantrekken hetgeen mogelijk effect kan hebben op het ecosysteem.

Verandering van biochemische routes

Door de expressie van genen coderend voor bepaalde enzymen of juist door uitschakeling van dergelijke genen kunnen biosynthese routes in de plant worden beïnvloed. Voorbeelden hiervan zijn veranderingen van bloemkleur of van de houdbaarheid van vruchten.

Bloemkleurmutaties komen in de natuur veelvuldig voor. Eventuele beïnvloeding van het ecosysteem door verandering in de herkenning van bloemen door insecten vindt in de natuur dus ook al zonder genetische modificatietechnieken plaats. Bovendien wordt door middel van mutatieveredeling al lang geselecteerd op nieuwe kleurschakeringen in siergewassen. Specifieke risico's zijn dan ook niet te verwachten. Een uitzondering moet hier gemaakt worden indien soortvreemde genen coderend voor enzymen

die nieuwe bloemkleuren veroorzaken in een gewas worden geïntroduceerd (bijv. maisgenen in petunia). Inschatting van het effect zal lastig zijn daar de interactie van het product met zijn omgeving onbekend is. Beïnvloeding van de houdbaarheid van vruchten zal effect hebben op het vrijkomen van het zaad hetgeen de natuurlijke verspreiding van de plant negatief zal kunnen beïnvloeden. Risico's zijn hiervan niet te verwachten.

2.2 Bijdrage van DLO aan het onderzoek

Voorlichting betreffende de biologische veiligheid van transgene gewassen

In oktober 1988 werd door de taakgroep Genmal van de NRLO een eerste studiemiddag georganiseerd waarbij enkele aspecten van de introductie van transgene planten in algemene zin aan de orde kwamen.

In januari 1989 is door het DLO-Centrum voor Plantenveredeling en Reproductieonderzoek (CPRO-DLO) een themadag georganiseerd getiteld "Risiko-analyse van transgene planten in de praktijk". Naast algemene inleidingen en specifieke informatie over een aantal gewassen werden veldproeven met transgene gewassen en het overheidsbeleid besproken. De lezingen zijn gebundeld in een uitgave van Prophyta, het vakblad voor teeltmateriaal voor land- en tuinbouw (1989, nr. 6, p. 220-222).

Onderzoek betreffende de aard van het gewas

Via kruising van cultuurplanten met wilde verwanten is verspreiding van transgenen naar het milieu mogelijk.

De afgelopen twee jaren zijn door het CPRO-DLO gegevens verzameld over de kruising van aardappel en tomaat met hun wilde verwanten. Voor aardappel is aangetoond dat uitkruising met zijn wilde verwanten, zwarte nachtschade en bitterzoet niet plaatsvindt in Nederland. Een door de PclB medegefinancierd soortkruisingsonderzoek, ook uitgevoerd bij het CPRO-DLO, heeft steekproef gewijs hetzelfde laten zien voor kruisingen van tomaat met zijn meest voorkomende wilde verwanten.

Inventariserend biosystematisch onderzoek naar het voorkomen van wilde verwanten van cultuurgewassen kan nuttig zijn bij het vaststellen van de kans op uitkruising. Bij het CPRO-DLO en de Vakgroep Plantentaxonomie van de Landbouwwuniversiteit Wageningen is in dit kader onderzoek gaande naar de genetische variatie bij grassen, terwijl dit in 1991 ook zal starten voor peen. Daarnaast bestudeert het Rijksherbarium te Leiden i.s.m. het CPRO-DLO en met mede financiering door het Ministerie van VROM de verspreidingspatronen van inheemse wilde en verwilderde planten en hun verwante cultuurplanten. De nadruk ligt vooralsnog op sla. Dit onderzoek is uiterst nuttig voor het vaststellen van de mate van verspreiding van genen vanuit cultuurplant naar de wilde flora.

Bij de Vakgroep Bijzondere Plantkunde van de Universiteit van Amsterdam vindt i.s.m. het CPRO-DLO een, door de PclB medegefinancierd, onderzoek plaats naar de verspreiding van genen bij grassen onder natuurlijke omstandigheden.

Voor biet is uitkruising vastgesteld met wilde verwanten in Nederland alsook in de zaadteeltgebieden rond de Middellandse Zee. In een litera-

tuurstudie uitgevoerd door het CPRO-DLO is een inventarisatie gemaakt van het voorkomen van wilde verwanten van biet in Europa en de kansen op het ontstaan van hybriden.

Onderzoek naar het adaptatievermogen van hybriden is uitgevoerd door CPRO-DLO. Indien een hybride tussen cultuurplant en wilde verwant is ontstaan moet vastgesteld worden of de hybride zich kan handhaven in de wilde populatie of zelfs een plaag kan worden. Wilde peen en cultuurpeen komen in Nederland in elkaars nabijheid voor. Bestuiving van wilde peen met pollen van cultuurpeen vindt dan ook plaats, maar voor zover kon worden nagegaan overleven de hybriden niet in het milieu, wat de kans op verdere gene flow uiterst klein maakt.

Indien hybriden gevormd kunnen worden is het van belang vast te stellen hoe een transgen zich in opeenvolgende generaties van de hybride populatie zal gedragen indien al dan niet selectiedruk wordt uitgeoefend op dat transgen. Om dit vast te stellen zal door het CPRO-DLO in 1991, met medefinanciering van het Ministerie van Economische Zaken, een onderzoek starten naar de verspreiding en stabiliteit van een reporter-gen en een herbicide resistentiegen aanwezig in hybriden tussen koolzaad en zijn wilde verwanten. Dit onderzoek zal in samenwerking met INRA, Le Rheu, Frankrijk worden uitgevoerd.

Onderzoek betreffende de aard van het transgen

Verandering van een beoogd expressiepatroon van een transgen kan een potentieel risico opleveren. Hierbij kan gedacht worden aan productie van toxinen tegen fytopathogenen in niet bedoelde organen. Vandaar dat in 1991 bij het CPRO-DLO in het kader van het EEG BRIDGE programma "Risk Assessment of Transgenic Organisms" een onderzoek gestart zal worden naar de voorspelbaarheid van de expressie van transgenen.

Met steun van het Ministerie van VROM vindt momenteel bij CPRO-DLO een inventarisatie van het gebruik van kanamycine in Nederland plaats. Deze inventarisatie moet inzicht geven in de extra belasting van het milieu door het gebruik van kanamycine bij de identificatie van transgene planten. Tevens zal deze studie inzicht moeten verschaffen in de mogelijkheid dat transgene, kanamycine-resistente planten wat betreft competitievermogen in het voordeel ten opzichte van de wilde flora die deze resistentie niet bezit.

2.3 Noodzaak tot verder onderzoek

Op dit moment wordt op verschillende plaatsen elders in Europa relevant onderzoek verricht.

In Engeland vindt momenteel een onderzoek plaats naar de overleving van koolzaad en aardappel in het milieu. Dit onderzoek zal gedurende drie jaren, op drie verschillende locaties (Cornwall, Midden Engeland en Schotland) herhaald worden om tot een verantwoorde uitspraak te komen.

Bij het John Innes Centre te Norwich vindt onderzoek plaats naar de kruisbaarheid van luzerne en zijn wilde verwanten.

Bovendien zal onderzoek starten naar het effect van een geïntroduceerd transposon op de stabiliteit van koolzaad.

In het kader van het EEG BRIDGE Risk Assessment Programma is een voorstel ingediend door een Belgisch/Deens/Amerikaans/Nederlands samenwerkingsverband om de mate van vitale pollenverspreiding door de wind bij biet te kwantificeren. Bovendien zal de groei, opbrengst, zaadproductie en zaadkwaliteit van transgene biet onder verschillende omstandigheden worden geanalyseerd. Ook zal het competitievermogen van hybriden tussen biet en zijn wilde verwanten worden vastgesteld.

Daarnaast zal de mate van verspreiding van transgenen vanuit koolzaad naar wilde verwanten in een veldproef worden vastgesteld. Deze veldproef zal bestaan uit een transgeen koolzaad-pollendonor veld ter grootte van 1 hectare en pollen vangpopulaties op verschillende afstanden van dit veld. De veldproef zal in Frankrijk, Engeland en België op identieke wijze uitgevoerd worden.

Men kan derhalve stellen, dat het overgrote deel van het huidige onderzoek erop is gericht meer te weten te komen van het adaptatievermogen van de cultuurplant in het milieu, het voorkomen van wilde verwanten, de mogelijke uitkruising van het gewas met zijn wilde verwanten, de mate van verspreiding van pollen van de cultuurplant, de fertiliteit en het adaptatievermogen van de hybride in het milieu. Voor de vaststelling van de biologische veiligheid van transgene planten zijn deze gegevens onontbeerlijk. Daarbij moet men zich realiseren dat niet alleen rekening gehouden moet worden met de flora in het teeltgebied van de transgene cultuurplant maar ook met de flora in de zaadwingebieden.

Het telen van transgene gewassen in hun oorsprongsgebieden zal daarnaast aanleiding geven tot hybridisatie met wilde verwanten. Kennis van het effect hiervan is vereist voor tot introductie van de transgene plant in deze gebieden wordt overgegaan.

Nederland wordt beschouwd als het oorsprongsgebied van grassen. Lopend onderzoek betreffende de genetische variatie bij grassen en de verspreiding van genen in populaties van grassen in Nederland, is in dit kader uiterst nuttig. Verder inventariserend onderzoek naar de verspreidingspatronen van inheemse wilde en verwilderde planten en hun verwante cultuurgewassen, zoals nu gebeurt voor sla door het Rijksherbarium te Leiden en het CPRO-DLO, is gewenst daar het een goed beeld zal opleveren over het voorkomen van hybridisatie tussen cultuurgewassen en hun wilde verwanten. Met deze gegevens kan de biologische inperking van deze cultuurgewassen goed worden voorspeld.

De biologische veiligheid van de transgene genproducten zal steeds van gen tot gen moeten worden geëvalueerd. Genproducten die ingrijpen op biochemische routes in de plant zullen niet simpel zijn te classificeren. Daarnaast zijn er algemene aspecten die de veiligheid van transgenen kunnen beïnvloeden zoals de mate van voorspelbaarheid van de expressie van transgenen.

Bij de introductie van transgene planten in het milieu kan niet altijd gesteld worden dat er geen enkel risico aan verbonden is. Dit kan echter ook niet gesteld worden bij de introductie van exoten en nieuwe rassen van gewassen die verbeterd zijn door het inkruisen van genen uit wilde verwanten. Doordat bij de introductie van transgene gewassen slechts een beperkt aantal nieuwe genen in het ecosysteem wordt geïntroduceerd, is de voorspelbaarheid van deze introductie relatief groot. Bekendheid met de aard van het gewas is hierbij essentieel. Indien de aard van het gewas

niet goed omschreven is zal daar onderzoek naar moeten worden uitgevoerd.

Met nadruk moet er op gewezen worden dat de ervaring met transgene gewassen onder veldomstandigheden snel toeneemt. In de Verenigde Staten zijn al meer dan 100 veldproeven uitgevoerd terwijl in Frankrijk dat aantal in de 40 loopt en er meer dan 70 zijn aangevraagd. Het betreft hier veldproeven met tabak, tomaat, aardappel, katoen, soja, luzerne, populier, komkommer, walnoot en mais.

De aandacht zal zich nu dan ook heel nadrukkelijk moeten richten op professionele publieksvoorlichting betreffende de mogelijk- en onmogelijkheden van de biotechnologie. Nadrukkelijk zal daarbij aandacht geschonken moeten worden aan opkomende vragen betreffende de biologische veiligheid van transgene gewassen en de maatschappelijke en economische aspecten van de toegepaste technologie.

3 Biologische veiligheid bij het gebruik van genetisch gemodificeerde micro-organismen in de bodem

Theoretisch zijn er grote mogelijkheden voor het gebruik van genetisch gemodificeerde micro-organismen in de bodem. Dit betreft mogelijkheden die betrekking hebben op verbetering van bekende niet gemodificeerde inocula zoals N₂-bindende organismen of antagonisten tegen bodemgebonden ziekten dan wel op nieuw geconstrueerde organismen, die bijvoorbeeld in staat zijn xenobiotica af te breken of bijvoorbeeld stoffen te produceren die toxisch zijn voor schadelijke insecten.

Concrete voorbeelden van het toepassingspotentiël van genetisch gemodificeerde micro-organismen zijn geleverd ten aanzien van de afbraak van milieuverontreinigende stoffen (respectievelijk 2,4,5-T en 3-Cl-benzoaat) en van de verbeterde colonisatie potentiël van Rhizobium.

Onbekendheid met het gedrag van dergelijk genetisch gemodificeerde micro-organismen, GGM's, in de natuur, is niet alleen de oorzaak van de tot nu toe geringe toepassing, maar natuurlijk ook van een terechte bezorgdheid over mogelijke risico's die aan de toepassing van GGM's verbonden is.

De exacte aard van deze risico's is moeilijk tot niet te omschrijven, maar theoretische scenario's kunnen wel aangegeven worden. Deze zijn bv. het ontregelen van het normale functioneren van het ecosysteem (bv. de diverse omzettingsprocessen die in de bodem plaatsvinden), het aantasten van organismen die niet tot de te bestrijden groepen van organismen behoren of het zodanig verdringen van natuurlijk voorkomende verwante organismen dat de normale functies die door deze organismen worden uitgevoerd in gevaar komen.

Ondanks het ontbreken van een duidelijk beeld van de exacte gevaren verbonden aan veldtoepassingen van genetisch gemodificeerde micro-organismen, kan wel gezegd worden dat de grootte van het risico op het optreden van de mogelijke gevaren waarschijnlijk gerelateerd zal zijn aan de mate van vestiging, overleving, eventuele groei en verspreiding van deze organismen. Daarnaast kan het geïntroduceerde DNA, naast de organismen per se, ook risico's opleveren, aangezien bij uiteindelijke dood van de geïntroduceerde microbiële cellen het geïntroduceerde genetische materiaal nog kan persisteren en na overdracht naar in de bodem aanwezige organismen gerepliceerd kan worden.

Mogelijke risico's zijn uiteraard onlosmakelijk verbonden met de in de bodem aangebrachte functie, d.w.z. het (beoogde of neven-) effect bepaalt uiteindelijk de risico's (alsmede de functionaliteit). De mate van expressie van de geïnserteerde genen onder omstandigheden in de bodem is daarom een facet van onderzoek wat zeker belicht zal moeten worden. Last but not least is het mogelijke optreden van omstandigheden die selecteren voor de aangebrachte eigenschap een punt van overweging. Dergelijke selectiekracht zou nl. door het aanbrengen van een selectief voordeel bij het ingebrachte organisme en gen, een ongewenste ontwikkeling van het GGM ten koste van andere organismen in de natuur tweeweg kunnen brengen.

Het grote struikelblok voor een goede risico inschatting van GGM's in de bodem is het ontbreken van adequate detektie technieken. Overigens is dit een probleem waardoor de ontwikkeling van de bodem microbiologie in het algemeen stagneert. Er zijn methoden voorhanden om specifieke micro-organismen na isolatie of insitu, als mede specifieke DNA-sequenties te bepalen. Echter waar de ene methode een lage detektie limiet kent van enkele organismen per gram grond, zoals de uitplaatmethode, maar waardoor slechts een deel (nl. die organismen die zich op een agarplaat kunnen ontwikkelen) van de totale populatie kan worden bepaald, heeft de andere methode, die het mogelijk maakt de totale populatie te bepalen, zoals de immunofluorescentie-methode, een veel te hoge detektie-limiet bij duizenden cellen per gram grond. Dat zelfs een detektie limiet, dwz het minimale aantal cellen per eenheid grond dat betrouwbaar aangetoond kan worden, van ± 10 nog niet volstaat om GGM's goed te volgen, toont het voorbeeld aan van Kilbane et al (Appl. Environm. Microb. 45, 1983) over de ontwikkeling van een bacterie met het vermogen om het herbicide 2,4,5 T af te breken. Ofschoon na 8 weken geen cellen m.b.v. selectieve agar platen (detektie limiet < 10 cellen/g grond) meer gedetekteerd konden worden, groeide de populatie van de betreffende stam binnen enkele dagen uit tot $\pm 10^6$ cellen per gram grond toen na 12 weken weer 2,4,5 T aan de grond werd toegevoegd. Dit voorbeeld toont aan hoe gevoelig detektie-methodieken dienen te zijn om een biologische veiligheid van GGM's goed te kunnen inschatten en tegelijkertijd hoe sterk een selectie voordeel teweeg gebracht door genetische manipulatie kan werken. Immers 2,4,5 T kon (alleen) door dit organisme als substraat worden gebruikt.

3.1 Factoren die de biologische veiligheid van genetisch gemodificeerde micro-organismen, GGM's, in de bodem bepalen

3.1.1 Vestiging, overleving en groei van geïntroduceerde micro-organismen (met name bacteriën)

De eerste factor bepalend voor de mogelijke risico's van GGM's is hun vestiging in het bodemmilieu. Daarnaast spelen overleving en mogelijke groei uiteraard een grote rol. Ervaring met introductie van ongemanipluleerde bacteriën in de bodem heeft geleerd dat juist de vestiging van veel bacteriën vaak problematisch is, hetgeen waarschijnlijk te wijten is aan de onaangepastheid van bacteriepopulaties opgekweekt in het laboratorium aan omstandigheden in de bodem en aan het feit dat organismen onmiddellijk na introductie niet terecht komen in hun natuurlijke niches. Slechte vestiging leidt tot een lage dichtheid van de geïntroduceerde populatie, tenzij substantiële groei ervan mogelijk is. Een slechte vestiging van bacteriële inoculantia is waarschijnlijk ook vaak de reden geweest van het mislukken van veel toepassingen in het verleden, bv. ten behoeve van de biologische bestrijding van bodemgebonden ziekten. Voor risico-inschat-

ting is de vraag van belang of het te introduceren organisme een mogelijk ecologisch voordeel geniet (bv. de afbraak van specifieke substraten) of een specifieke ecologische niche kan bezetten (bv. rhizobia-wortelknollen). Dergelijke organismen kunnen zich veel makkelijker vestigen. De huidige kennis over vestiging en overleving van micro-organismen in de bodem, nog voornamelijk opgebouwd aan de hand van resultaten met ongemanipuleerde micro-organismen, laat een vrij divers beeld zien; organismen zoals rhizobia hebben zich na introductie vaak zeer persistent getoond (echter weinig effectief waar het gaat om de vorming van wortelknolletjes). Dit geldt natuurlijk ook voor sporevormende organismen zoals *Bacillus*, hoewel er aanwijzingen zijn dat slechts de in het start-inoculum-aanwezige sporen overleefden. Andere organismen, ook de typische bodem bacteriën zoals *Pseudomonas*, vestigden zich vaak slecht, d.w.z. geringe aantallen overleefden. De mate van vestiging is dus afhankelijk van de bacteriesoort. Duidelijk is dat interactieve processen, zoals competitie- predatie en antogonisme van geïntroduceerde organismen met de natuurlijke bodemflora en -fauna, een dominante rol spelen in de mate van vestiging van het geïntroduceerde micro-organisme. Aangezien deze interacties sterk bepaald worden door de bodem-structuur en -textuur blijkt de bodem-matrix in dit verband een van de meest belangrijke factoren te zijn. Er treden dan ook aanzienlijke verschillen op in de mate van vestiging van geïntroduceerde micro-organismen in verschillende bodem-typen. Ook factoren zoals pH en bodemvocht-omstandigheden spelen een belangrijke rol.

3.1.2 Transport van geïntroduceerde micro-organismen

Indien geïntroduceerde genetisch gemodificeerde organismen, GGM's, potentiële risico's kunnen opleveren voor het ecosysteem, is het uiteraard wenselijk verspreiding zoveel mogelijk te beperken. Verspreiding van micro-organismen in de bodem kan in principe via een actief of passief proces plaatsgrijpen. Actief transport, via flagellaire beweging, is in het algemeen beperkt tot afstanden in de orde van millimeters of minder en is voor het risico-analyse vraagstuk waarschijnlijk niet van groot belang. Anders ligt het voor passieftransport via waterbewegingen in de grond, via vectoren zoals groeiende plantewortels of bodemdieren of, bovengronds, via windbewegingen. Verplaatsingen over grotere afstanden, zijn dan denkbaar.

De huidige beschikbare kennis over transport van bacteriën in de bodem is voornamelijk verkregen met behulp van ongemanipuleerde bacteriën. Water, percolerend door een grond was in staat recent geïntroduceerde cellen te verplaatsen over afstanden in de orde van meters. De mate van verplaatsing is daarbij zeer sterk afhankelijk van het percolatieregime (hoeveelheid en snelheid van waterinput) alsmede van het bodemtype (klei versus zand). Er zijn preliminaire modellen ontwikkeld om transport van geïntroduceerde bacteriën door water in grond te beschrijven, waarbij o.m. celgrootte, adsorptie aan de bodem en het filtering- effect belangrijke factoren waren. Deze modellen behoeven nog nadere uitwerking en toetsing. Voorts is een model ontwikkeld voor voorspelling van transport van micro-organismen via windbewegingen, waaruit bleek dat er sterke

verdunding optrad van de geïntroduceerde bacteriën over afstanden in de orde van meters.

3.1.3 Horizontale genoverdracht door geïntroduceerde micro-organismen

Overdracht van een geïnserteerd gen vanuit het geïntroduceerde GGM naar de autochtone microflora is een risicofactor, aangezien het gen zich door de autochtone persistente microflora zou kunnen verspreiden, wat zou kunnen leiden tot onvoorziene consequenties. Genoverdracht is ook een proces dat ongetwijfeld plaats zal vinden tussen geïntroduceerde GGM's en de natuurlijke populatie. De kernvraag is dan ook niet: "of gen overdracht plaats vindt, maar in welke mate en welke factoren de overdrachtfrequentie bepalen." Genoverdracht tussen bacteriën kan in principe gebeuren via drie mechanismen: transformatie, transductie of conjugatie. Door verschillende auteurs is erop gewezen dat in veel gevallen overdracht via conjugatie, het overbrengen van genetisch materiaal van een donorcel naar een receptorcel via cel-cel contact, het meest waarschijnlijk en meest frequent zal voorkomen. Gezien het grote aantal bacteriofagen en de hoge mate van persistentie van DNA in veel ecosystemen (waaronder ook grond) is het onzeker of transformatie (opname van extracellulair DNA door een microorganisme) en transductie (overdracht van DNA via een bacteriofaag als vector) niet ook een rol spelen. Studies naar het optreden van conjugatieve genoverdracht tussen geïntroduceerde donor- en receptorbacteriën in de bodem hebben laten zien dat overdracht van zelfoverdraagbare plasmiden met een wijd gastheerbereik in de bodem plaatsvindt bij hoge celdichtheden of celactiviteit, dwz in aanwezigheid van nutriënten, een fysiologisch gunstige temperatuur en/of in aanwezigheid van plantewortels. Na ontwikkeling van een specifieke techniek van donor-contraselectie is nu ook overdracht naar autochtone bacteriën aangetoond.

3.1.4 Invloed van bodem factoren op de selectie van het heterologe gen

De mate van (eventuele) selectie van het geïnserteerde gen door in de bodem heersende of optredende condities is van belang voor zowel de overleving van het geïntroduceerde dragerorganisme alsook voor de mate van genoverdracht. Het is daarom van belang ieder nieuw te introduceren gen te controleren op een selectief voordeel in de bodem. Van veel reeds toegepaste of ontwikkelde genen is een eventueel selectievoordeel eenvoudig te voorspellen uit de aard van het genproduct, bv in het geval van resistentie tegen antibiotica of zware metalen of in geval van genen die cellen in staat stellen een bepaald substraat als enige C- en energiebron te gebruiken zoals in het voorbeeld van 2,4,5 T. In andere gevallen is eventuele positieve selectie niet gemakkelijk te voorspellen en zal een screeningsprogramma verricht moeten worden. In een dergelijk programma zal

het effect van een aantal bodemcondities op het organisme en het gen bestudeerd moeten worden. Onze huidige kennis t.a.v. het effect van bodemfactoren, en met name van de wisselende klimaats omstandigheden die in het veld optreden, op het lot van genen in geïntroduceerde organismen schiet nog te kort voor modelmatige voorspellingen.

3.2 Bijdrage van DLO aan het onderzoek

Het huidige onderzoek naar de biologische veiligheid van geïntroduceerde micro-organismen wordt op diverse punten door DLO ondersteund, hetzij via directe inspanning van vaste DLO medewerkers, hetzij via tijdelijk aangestelde medewerkers met financiële steun van derden zoals de EEG, en PCLB. Veel van het onderzoek wordt verricht op het DLO-Instituut voor Bodemvruchtbaarheid (IB-DLO), vestiging Wageningen.

In de eerste plaats zijn de huidige inspanningen in het onderzoek erop gericht een beter inzicht te verkrijgen in de ecologie van bacteriële populaties na introductie in de bodem ten einde voorspellingen te kunnen maken over het lot van de geïntroduceerde bacteriën in de bodem. Het onderzoek heeft zich tot nu toe vooral gericht op de betekenis van de bodem als leefmilieu voor geïntroduceerde micro-organismen. De bodemmatrix is een dominante factor die in hoge mate interacties tussen (micro)-organismen bepaalt en daarmee het lot van GGM's. Voortbouwend op de kennis die opgedaan is gedurende dit onderzoek, wordt nu ook een studie verricht naar de mogelijkheden om door middel van veranderingen van de bodemtextuur met behulp van kleimineralen die samen met bacteriën in de bodem worden gebracht, de overleving van de geïntroduceerde bacteriën te verbeteren. Ook de betekenis van de metabole toestand van micro-organismen op het moment van inoculatie voor hun gedrag in de bodem is onderzocht.

Een tweede item van huidig DLO onderzoek is de overdracht van genen vanuit een geïntroduceerd (donor) organisme naar de autochtone microbiele populatie in afhankelijkheid van de localisatie van het heterologe gen in het genoom. Dat wil zeggen dat donorstammen gebruikt worden waarbij het gen zich bevindt op een plasmide, transposon of chromosoom. Dit onderzoek heeft zich voorlopig beperkt tot studies in kleinere laboratoriumsystemen, waarbij als belangrijke factor de aanwezigheid van een actief wortelstelsel bestudeerd wordt. Het blijkt dat de frequentie van genoverdracht toeneemt in de onmiddellijke omgeving van de wortel, de rhizosfeer. Deze waarneming is des te meer van belang voor het vaststellen van de biologische veiligheid van GGM's aangezien belangrijke toepassingsmogelijkheden van GGM's in de bodem juist gepland zijn in relatie tot gewasproductie en dus in de rhizosfeer.

Voorts is onderzoek gaande naar het transport van genetisch gemodificeerde micro-organismen in de bodem in afhankelijkheid van relevante bodem- en bacteriele factoren. Watertransport wordt hierbij gezien als de meest relevante factor waarbij voor Nederland relevante regenregimes worden gesimuleerd. In het kader van een EEG-project in samenwerking met de Universiteit van Exeter, UK, wordt gekeken naar de invloed van bodeminvertebraten op het transport, de overleving en genoverdracht van genetisch gemodificeerde micro-organismen.

Een laatste belangrijke onderzoeksinspanning wordt momenteel geleverd op het gebied van detectie van geïntroduceerde micro-organismen en hun DNA. Zoals reeds vermeld is, is het tot nu toe moeilijk gebleken geïntroduceerde bacteriën of hun DNA op lage niveaus te detecteren, wat voornamelijk te wijten is aan algemene technische problemen met het werken met bodems. Het detectieprobleem wordt op het IB-DLO aangepakt via het ontwikkelen en inserteren van specifieke markers in het genoom van te introduceren micro-organismen. Deze markers bestaan uit DNA sequenties of genen die het mogelijk maken de organismen specifiek aan te tonen in het bodemmilieu of te bepalen na isolatie. Zowel selecteerbare markers (antibioticum-resistentiegenen) alsook niet-selecteerbare sequenties (hybridisatiemarkers) worden gebruikt. Detectie van de bacteriën gebeurt vaak via een combinatie van klassieke (selectieve) plaatstechnieken en moleculaire technieken zoals kolonie-hybridisatie, dot-blot-hybridisatie of polymerase ketting reactie (PCR). De detectielimieten die haalbaar zijn met deze technieken variëren met de soort marker en het gebruikte systeem. Ten einde vooral de detectielimieten te verlagen, wordt met name aandacht geschonken aan het optimaliseren van PCR detectietechnieken. Deze techniek heeft potentieel de mogelijkheid om uiteindelijk de haalbare detectiegrenzen te verleggen, naar bv. 1 cel per g grond of minder. Huidige haalbare detectielimieten, ook met PCR, liggen evenwel nog enkele logeenheden hoger, wat te wijten is aan persisterende verontreinigingen in DNA-preparaten verkregen uit bodemmonsters.

3.3 Noodzaak tot verder onderzoek

De kennisontwikkeling ten aanzien van de biologische veiligheid van GGM's in de bodem is gerelateerd aan de ontwikkeling van de algemene kennis van de ecologie van micro-organismen in de bodem. De problemen die hierbij een rol spelen zoals de gebrekkige methodieken voor de bepalingen van aantallen en activiteit, de heterogeniteit van de bodem en de nauwelijks ontwikkelde theorievorming, bepalen natuurlijk ook de kennisontwikkeling op het gebied van de biologische veiligheid van GGM's in de bodem. Enkele meer specifieke facetten die nader onderzoek behoeven zijn hier onder in volgorde van prioriteit weergegeven.

Detectie

Zoals in hiervoor reeds is geschetst, is detectie van lage aantallen gemodificeerde micro-organismen vereist voor een maximaal mogelijke inschatting van eventuele risico's. De uitstekende mogelijkheden die PCR biedt, dienen zo goed mogelijk te worden ontwikkeld. Het IB-DLO kan gezien haar expertise een belangrijke bijdrage kan leveren in dit verband.

Biologische inperking

Het is in principe mogelijk de overleving van geïntroduceerde micro-organismen te controleren met behulp van zg. host-killing (hok-) genen geïnserteerd in het genoom. Een GGM voorzien van een werkzaam hokgen zou in principe na introductie in de bodem intrinsiek veilig zijn, d.w.z. het organisme zou uiteindelijk uit het ecosysteem verdwijnen. Het *hok*-gensysteem is enkele jaren geleden in Denemarken (S. Molin et al) ontdekt en

verder ontwikkeld en is beschikbaar voor gebruik in organismen die op het IB-DLO en IPO-DLO gebruikt zullen worden als dragers voor genen ter bestrijding van emelten in graslanden. Dit terrein van onderzoek behoeft de komende jaren sterke ondersteuning, daar het een mogelijkheid biedt op een inherent veilige manier micro-organismen in de bodem te introduceren en weer te laten verdwijnen. Het onderzoek zal zich, in samenwerking met de Deense partner en met financiële steun van de EEG, richten op de verdere ontwikkeling van de toepasbaarheid van het hok-gen-systeem voor genoemde dragerorganismen, en de toepassing ervan in microcosmos-, kas- en veldproeven.

Transport

Enkele relevante vragen die antwoord behoeven zijn:

1. of verschillende organismen op grond van hun oppervlakte-eigenschappen op een verschillende wijze met bodemdeeltjes interageren en daarom verschillend getransporteerd worden,
2. of transportverschijnselen samenhangen met de fysiologische gesteldheid van de geïntroduceerde bacterien en met de tijdsduur van verblijf in de grond en
3. of het mogelijk is bacteriën in de bodem te verankeren door middel van toevoeging in een carrier of door manipulatie van hun fysiologische gesteldheid op het moment van introductie.

Uiteraard is het van belang een goed voorspellend model te ontwikkelen dat het transportgedrag van geïntroduceerde bacterien nauwkeurig aan kan geven. Samenwerking tussen het IB-DLO en de Vakgroep Microbiologie van de Landbouwniversiteit Wageningen wordt overwogen.

Gen-expressie en -relatie

Zoals reeds vermeld, wordt de mate van risico van een geïnserteerd gen in een GGM in de bodem ook bepaald door de mate van expressie ervan onder in de bodem heersende omstandigheden. Tevens wordt uiteraard de effectiviteit van de toepassing van het GGM hierdoor bepaald. Er is nog slechts weinig bekend over de mate waarin via genetische modificatie geïnserteerde genen in een bodemsysteem werkzaam kunnen zijn en in hoeverre bodemomstandigheden de expressie beïnvloeden. Een van de redenen hiervoor is, het ontbreken van geschikte, gevoelige technieken voor het bestuderen van genexpressie in een complex systeem als de bodem. Hierbij valt te denken aan detectie op mRNA of eiwitniveau. Uiteraard is vaak het uiteindelijke beoogde effect wel te meten. Echter, in die gevallen waarin (nog) onvoldoende effect via deze weg gemeten wordt kan juist via moleculaire detectietechnieken gekeken worden naar mogelijke oorzaken hiervan. Het wordt van groot belang geacht deze moleculaire detectietechnieken van genexpressie in de bodem verder te ontwikkelen, waarbij mRNA detectie via reverse transcriptase/PCR detectie in principe zeer geschikt lijkt, naast directe detectie van het genproduct.

Biologische veiligheid van organismen anders dan bacterien

De huidige kennisontwikkeling aan biologische veiligheid van genetisch gemodificeerde micro-organismen is bijna uitsluitend gericht geweest op bacterien. De reden hiervan is dat de toepassing van genetisch gemodificeerde bacterien in de tijd het dichtst bij ligt. Met het beschikbaar komen van technieken om ook bodemschimmels genetisch te manipuleren en met het oog op de vele potentiële toepassingen van schimmels in de bodem (bijv ten behoeve van de bestrijding van bodempathogen en de afbraak van xenobiotica), is het zeer gewenst om ook onderzoek te starten naar de biologische veiligheid van genetisch gemodificeerde schimmels. De sterk verschillende levenswijzen van schimmels in vergelijking tot die van bacteriën maakt dat de huidige kennis van de ecologie van (genetisch gemodificeerde) bacteriën slechts in zeer beperkte mate toepasbaar is voor vaststelling van de risico's van het gebruik van genetisch gemodificeerde schimmels in de bodem. Samenwerking met DLO Instituut voor Planteziektenkundig onderzoek (IPO-DLO) en AFRC-HRI, UK wordt overwogen. Op het IPO-DLO is kortgeleden onderzoek gestart naar de biologische veiligheid van genetisch gemodificeerde nematoden.

Genoverdracht via transductie en transformatie

Hoewel nu meer kennis beschikbaar is aangaande de conjugatieve overdracht van zelfoverdraagbare plasmiden, ontbreekt nog veel kennis over de overdrachtsfrequentie van DNA-sequenties gelocaliseerd op niet-zelfoverdraagbare sequenties, op transposons of op het chromosoom van geïntroduceerde bacterien. Het toekomstige onderzoek zal zeker deze leemtes moeten opvullen, d.w.z. een poging moeten doen de mate van overdracht van genen geïnserteerd op deze zogenaamd "veilige" plaatsen in het genoom verkennen. Kennis over eventuele transductionele of transformationele overdracht van in de bodem geïntroduceerde genen is wereldwijd nog fragmentarisch. Ook de huidige inspanningen in Nederland zijn minimaal. Het lijkt zinvol in ieder geval de mogelijkheid van genoemde overdrachtsprocessen te beschouwen in het onderzoek naar overleving (het lot) van geïntroduceerde bacterien en hun DNA met name in lange termijn experimenten.

Ecosysteem effecten

Op het IPO-DLO is een voorspellend bodemvoedselweb-model (het model-de Rooter) ontwikkeld, hetgeen wellicht geschikt gemaakt zou kunnen worden om effecten van introducties van genetisch gemodificeerde micro-organismen op ecosysteemniveau te beschrijven. Het verdient aanbeveling de mogelijkheden hiertoe in toekomstige inspanningen te verkennen. Tot nu toe is het onderzoek op een enkele uitzondering na uitgevoerd onder gecontroleerde laboratoriumcondities. Het is bekend dat de vaak sterk wisselende condities een grote invloed hebben op het lot en het gedrag van micro-organismen in de bodem. Derhalve is het noodzakelijk om ook in het kader van de biologische veiligheid van GGM's in de bodem veldexperimenten uit te voeren. In samenwerking met verschillende andere instellingen binnen Nederland zijn stappen ondernomen om het eerste gezamenlijke kas-/veldexperiment met GGM's uit te voeren.

4 Biologische veiligheid bij het gebruik van genetisch gemodificeerde vaccins

De recombinant DNA technologie is in het afgelopen decennium een zeer krachtig werktuig gebleken bij de ontwikkeling van levende virusvaccins en van virale vectoren voor de insertie van heterologe genetische informatie.

De technologie biedt de mogelijkheden om gericht gewenste veranderingen aan te brengen in levende virusvaccins. In tegenstelling tot conventioneel geattenueerde vaccins, zijn deze gerecombineerde vaccins beter gekarakteriseerd en dragen daardoor een kleiner risico tot terug-mutatie naar virulentie. Door in apathogene vaccinvirussen heterologe genen te inserteren, kan bovendien protectie tegen meerdere ziekten geïnduceerd worden.

Geschikte vectoren zijn met name grote DNA virussen als pokkenvirussen en herpesvirussen. Verwacht wordt dat multivalente recombinantvaccins gebaseerd op deze vectorvirussen in de naaste toekomst toegepast zullen worden in de veehouderij.

In België is inmiddels een veldstudie uitgevoerd met een recombinant vaccinia-rabies vaccin, dat bescherming tegen rabies induceert in vossen en veilig is voor andere diersoorten (Pastoret et al., Vet. Rec. 123, 481, 1988). Er werden geen ongewenste effecten waargenomen. Niettemin blijft er grote behoefte bestaan aan meer experimentele gegevens over mogelijke risico's bij het gebruik van gerecombineerde levende vaccins. Deze gegevens zijn gewenst voor een veilig gebruik van deze vaccins in het milieu en daarnaast voor het opstellen van veiligheidsregels op basis van wetenschappelijke kennis.

4.1 Factoren die de biologische veiligheid van genetisch gemodificeerde vaccins bepalen

Het onderzoek naar de biologische veiligheid van genetisch gemodificeerde vaccins sluit nauw aan bij "moleculair-pathogenetisch" onderzoek, waarbij wordt beoogd de rol van afzonderlijke genen in de pathogenese van infectieziekten vast te stellen. Onze kennis op dit gebied is echter nog beperkt. Bovendien hebben we te maken met een groot aantal pathogenen en pathogene mechanismen. Dit brengt met zich mee dat de resultaten van een "risk-assessment" onderzoek niet zonder meer zijn te generaliseren. Een belangrijk risico-element van levende recombinant-vaccins is de mogelijke verandering in het biologisch gedrag van het dragervirus als gevolg van de expressie van een gen(en) van andere micro-organismen. Onderzoek naar de biologische veiligheid van genetisch gemodificeerde vaccins dient zich dan ook te richten op analyse van de volgende gebeurtenissen.

1. De mogelijke veranderingen in cel-, weefsel- of gastheertropisme (het vermogen van een virus om bepaalde cellen, weefsels dan wel dier-

soorten te infekteren) van het dragervirus als gevolg van de inbouw van heterologe genen en een daarmee gepaard gaande mogelijke toename of verandering van pathogene eigenschappen van het dragervirus voor de eigen gastheer of andere species.

2. De mogelijkheid van in vivo recombinitie tussen levend recombinant-virus en het homologe virulente veldvirus. Daarmee kan overdracht plaatsvinden van het heterologe gen naar veldvirussen. Dit kan dus leiden tot een "veldvirus" met gemodificeerde patho-biologische eigenschappen.
3. Stabiliteit en overleving van levende recombinant-virussen in de natuurlijke gastheer; mogelijke verspreiding naar andere dierspecies (verspreiding in het milieu).

Een adequate uitvoering van dit onderzoek vergt derhalve naast de moleculair-virologische inbreng veel aandacht voor de bestudering van de pathobiologische effecten van levende recombinant vaccinvirussen.

4.2 Bijdrage van DLO aan het onderzoek

Als modelsysteem wordt op het DLO-Centraal Diergeneeskundig Instituut (CDI-DLO) een geattenuëerd levend Aujeszky virus (ADV) vaccin gebruikt, dat apathogeen is voor biggen, runderen, schapen en muizen. Het virus mist de genetische informatie coderend voor het glycoproteïne-gI en het thymidine-kinase eiwit. Deze ADV deletiemutant, alsmede het uitgangsvirus, replicateert niet of slechts in zeer geringe mate in darmepitheel en lymfoïd weefsel. Dit virus zal als drager fungeren van oppervlakte antigenen van andere virale agentia. In eerste instantie wordt het E1-gen van varkenspestvirus (repliceert in lymfocyten) en het E2-gen van het varkens-transmissible-gastroenteritis-virus (darmpathogeen) tot expressie gebracht, zodat mogelijke veranderingen in weefsel-tropisme binnen de eigen gastheer bestudeerd kunnen worden. Deze genen zijn in gecloneerde vorm beschikbaar. In latere fasen van het onderzoek zal het F en/of G-eiwit van het bovine-respiratory-syncytial virus tot expressie worden gebracht, waarbij met name het aspect gastheertropisme bestudeerd zal worden.

Naar verwachting zullen recombinant-ADV-vaccins toegepast worden als bi- of multivalente vaccins voor vaccinatie van varkens. Het CDI-DLO beschikt over een aanzienlijke expertise aangaande het virus van de ziekte van Aujeszky i.e. beschikbaarheid van virologische, moleculair-biologische en pathologische kennis en onderzoeksmethoden.

Faciliteiten, vergunningen en expertise voor laboratoriumwerk (CII) en experimenten bij kleine en grote proefdieren met recombinant DNA micro-organismen (vergelijkbaar met of hoger dan CII) zijn beschikbaar bij het CDI-DLO.

Het onderzoek concentreert zich op bovengenoemde punten, d.w.z. veranderingen in pathologisch gedrag als gevolg van inbouw van heterologe genetische informatie, frequentie van recombinitie, en stabiliteit en overleving van gerecombineerde virussen in het milieu.

In het eerste jaar van het project (1991) richt het onderzoek zich op het opzetten en toetsen van (immuno)-histologische en moleculair-biologische technieken voor de detectie van (latent) recombinantvirus in diverse weefsels van geïnfecteerde biggen alsmede op de constructie van recombinantvirussen.

Delen van dit onderzoek worden gefinancierd door DLO, PCLB en PCiB. Tevens is een subsidie-aanvraag bij het EEG programma BRIDGE ingediend.

4.3 Noodzaak voor verder onderzoek

Het biologisch veiligheidsonderzoek bij het CDI-DLO sluit nauw aan bij het onderzoek, waarbij wordt beoogd de rol van afzonderlijke genen in de pathogenese van infectieziekten vast te stellen. Het knelpunt bij de uitvoering van dit onderzoek is dat basale kennis over genetische factoren die virulentie, weefsel-tropisme en gastheertropisme van virussen beïnvloeden slechts fragmentarisch aanwezig is. Uitbreiding van meer algemene kennis over weefsel-specifieke regulatie van genexpressie en de relatie tussen structuur en functie van virale eiwitten is nodig. Onderzoek naar het biologisch gedrag van meerdere recombinantvirussen is daarom gewenst, met name onderzoek naar het effect van inbouw van heterologe genen, afkomstig van verschillende micro-organismen met een uiteenlopend weefsel- en gastheertropisme.

In het bijzonder zal aandacht geschonken dienen te worden aan de ontwikkeling van basale kennis en methodes inzake de weefsel- en gastheerspecificiteit van het virus van de ziekte van Aujeszky, dan wel van het virus dat het heterologe gen levert.

Dit onderzoek valt niet los te zien van de beschermende effectiviteit van de recombinant vaccins.

Bij de nadere invulling van het risico-assessment onderzoek zal aandacht gegeven dienen te worden aan algemene aspecten die van belang kunnen zijn voor risico-inperking en inschatting. Hierbij valt te denken aan:

1. de route van applicatie van levende recombinant-vaccins, voor de analyse van ongewenste effecten,
2. modificatie van te inserteren genen, b.v. al dan niet verwijderen van genetische informatie essentieel voor expositie van het tot expressie gebrachte antigen op het virale en cellulaire oppervlak; invloed van heterologe enhancer- en promotor-sequenties; mogelijke inbouw van "suicide genes".

5 Samenvatting

De stand van het onderzoek naar de biologische veiligheid van genetisch gemodificeerde organismen is zeer verschillend voor planten, micro-organismen of vaccins. Terwijl mondiaal tientallen veldexperimenten met transgene gewassen zijn of worden uitgevoerd, zijn slechts enkele veldexperimenten met genetisch gemodificeerde micro-organismen en vaccins bekend. Dit heeft ongetwijfeld consequenties voor de mate van onderzoek naar de biologische veiligheid van transgene organismen in het milieu. Echter voor elk van de organismen, of het nu planten, micro-organismen of vaccins betreft, zal een "case-by-case" benadering noodzakelijk blijven, zoals dat ook in Nederlandse en EEG wetgeving (regels) is gesteld. Voor de vaststelling van risico's van het in het milieu brengen van transgene gewassen zijn twee factoren van essentieel belang, t.w. de aard van het gewas en de aard van de transgene eigenschap. In het onderzoek heeft steeds centraal gestaan (en staat nog steeds):

1. het adaptatie vermogen van de cultuurplant in het milieu,
2. het vóórkomen van wilde verwanten en de mogelijkheid tot uitkruisen van het gewas met deze verwanten,
3. de mate van verspreiden van pollen en
4. de fertiliteit en adaptatievermogen van eventuele hybriden in het milieu.

Vele cultuurgewassen zijn zover gedomestificeerd, dat zij zich niet kunnen handhaven in het milieu. Dit geldt echter niet voor bijvoorbeeld competitief zeer sterke gewassen als gras. Inventariserend onderzoek naar verspreidingspatronen van uitheemse wilde en verwilderde planten geeft een goed beeld van de mogelijkheden tot hybridisatie tussen cultuurgewassen en hun wilde verwanten. Evenzeer, zal ook biologische veiligheid van de transgene producten plant- en gen- specifiek moeten worden geëvalueerd.

Naast deze "case-by-case" evaluatie zal vooral aandacht moeten worden geschonken aan een adequate publieks-voorlichting over (de analyse van) eventuele risico's van het gebruik in samenhang met het nut van transgene gewassen.

Een exact beeld van de eventuele gevaren of nadelige effecten op ecosysteem niveau van het gebruik van genetisch gemodificeerde micro-organismen, GGM's in de bodem is moeilijk te geven. Zowel een succesvolle toepassing als ook de biologische veiligheid van genetisch gemodificeerde micro-organismen in de bodem worden voor alles bepaald door de mate van vestiging, dwz overleving, van het transgene micro-organisme. Dit leidt tot een inherent conflict tussen het effectief gebruik en de biologische veiligheid van GGM's. Immers, uit het oogpunt van een effectief gebruik is het vaak gewenst maximale aantallen van een GGM in de bodem te handhaven gedurende bepaalde periode, terwijl de risico's die eventu-

eel verbonden zijn aan het introduceren van een GGM zullen afnemen met het verkorten van de verblijftijd van het GGM in de bodem.

Een oplossing voor dit conflict kan wellicht gevonden worden in het gebruik van het zg. hokgen of "zelfmoord"-gen, waardoor een biologische inperking wordt aangebracht die er voor zorgt dat het geïntroduceerde GGM op den duur uit het milieu verdwijnt.

Andere factoren die de biologische veiligheid van transgene micro-organismen in de bodem bepalen zijn, de mate van verspreiding van de geïntroduceerde micro-organismen en de mate en frequentie van horizontale gen-overdracht.

Essentieel voor het vaststellen van de biologische veiligheid van GGM's in de bodem is de beschikbaarheid van adequate detektiemethoden van organisme en genen. Bestaande methoden zijn ontoereikend om ook kleine aantallen organismen te detekteren.

Prioriteit in nader onderzoek dient te liggen bij:

1. de verbetering van detektie-methoden voor GGM's en gen-expressie in de bodem,
2. het gebruik van biologische inperking en
3. transport van GGM's door de bodem.

Het onderzoek dient niet beperkt te worden tot bacteriën, zoals tot nu toe het geval is geweest, ook zal aandacht besteed moeten worden aan de biologische veiligheid van transgene schimmels en mogelijk nematoden in de bodem.

Het onderzoek zal zich op korte termijn dienen te verplaatsen naar het veld om het gedrag van GGM's onder de vaak sterk wisselende veld condities nader te kunnen bestuderen.

Een eerste veldexperiment in België met een genetisch gewijzigd vaccinia virus dat een rabies gen draagt, heeft geen ongewenste effecten te zien gegeven.

Toch is er nog een grote behoefte aan meer experimentele gegevens om de biologische veiligheid van transgene vaccins te kunnen voorspellen.

Aandachtspunten hierbij dienen te zijn:

1. mogelijke veranderingen in het gastheervaccin tengevolge van de inbouw van het heterologe gen en de daarmee samenhangende veranderingen in de (pathogene) eigenschappen van het virus,
2. de mogelijkheid van in vivo recombinatie tussen het recombinant virus en het homologe virulente veldvirus en
3. de stabiliteit en overleving van levende recombinant virussen in de natuurlijke gastheer.

Onderzoek op verschillende DLO instituten, m.n. CPRO-DLO, IB-DLO en CDI-DLO heeft een belangrijke bijdrage geleverd aan de huidige kennis