



Van plant tot gewas:

Het verleden, heden en de toekomst van plantenveredeling

Inhoud

Samenvatting	3
Feiten en cijfers	4
1. Genetica en potgrond	5
<i>Meer en beter voedsel</i>	6
<i>Stilstaan is achteruit gaan</i>	8
2. Plantenveredeling tot het jaar 2000	10
<i>Selecteren, kruisen en selecteren</i>	11
<i>F1-hybriden: 1+1=3</i>	12
<i>Kruisen van onkruisbare soorten</i>	14
<i>Selectie met merkers</i>	15
<i>Mutatieveredeling</i>	16
<i>Genetische modificatie</i>	17
3. Nieuwe veredelingsmethoden	20
<i>Geen aanpassing van planten-DNA</i>	21
<i>Enten</i>	21
<i>Reverse breeding</i>	22
<i>Versnelde veredeling voor bomen en struiken (Fast-track breeding)</i>	23
<i>Agro-infiltratie</i>	25
<i>Mutatieveredeling 2.0</i>	27
<i>RNA-afhankelijke DNA-methylatie</i>	27
<i>Oligonucleotide-directed mutagenese</i>	28
<i>CRISPR/Cas</i>	30
<i>Cis- en intragenese</i>	35
<i>Cisgenese</i>	35
<i>Intragenese</i>	36
<i>GGO 2.0</i>	36
<i>SDN-3</i>	37
4. Besluit	39
5. Referenties	40

Samenvatting

Wanneer het woord plantenbiotechnologie valt, gaat dit bijna steeds samen met een discussie rond genetisch gewijzigde (GGO-) gewassen. Echter, het doelgericht genetisch aanpassen van gewassen met behulp van de GGO-technologie is slechts een van de vele mogelijkheden om planten beter te doen beantwoorden aan onze behoeften. In dit achtergrondossier schetsen we hoe de gewassen die we van vandaag kennen, geëvolueerd zijn uit de natuur. Vooral de rol van de mens wordt hierbij toegelicht.

Sinds het ontstaan van de landbouw – zo'n 10.000 jaar geleden – heeft de mens planten naar zijn hand gezet. Enerzijds werden alleen de best presterende planten uit de natuur gehaald en bijgehouden. Anderzijds werden interessante kenmerken die spontaan ontstonden, door menselijke selectie verankerd in bepaalde gewassen en dit vaak tegen de natuurlijke selectie in. De ontdekking van de erfelijkheidswetten door Mendel op het einde van de 19de eeuw bracht het aanpassen van planten in een stroomversnelling. Met de ontdekking van de DNA-structuur in 1953 door Watson en Crick vergrootte de kennis van het erfelijk materiaal aanzienlijk. Nieuwe methoden die rechtstreeks ingrijpen op het DNA zagen het licht; eerst de mutatieveredeling rond 1960 en later de recombinante DNA-technologie of GGO-technologie in 1983. Door de toenemende kennis van plantengenetica en vooral door verbeterde DNA-analysmethoden konden bestaande technieken (zoals kruisen) opgewaardeerd worden tot merker-geassocieerde veredeling. Niettegenstaande vele technieken elkaar opvolgden, vervangen ze elkaar niet. In specifieke gevallen hebben ze allemaal een meerwaarde en het beschikken over de verschillende technieken geeft plantenveredelaars het gereedschap om tot nieuwe rassen te komen.

Plantenveredeling staat niet stil. Met de opkomst van nieuwe technieken komt ook een discussie op gang over de noodzaak, potentiële risico's en regelgevingstechnische aspecten ervan. Als gevolg van het debat rond GGO's krijgen bepaalde nieuwe veredelingstechnieken – vaak aangeduid met de afkorting NBT (afkomstig van New Breeding Technologies) – steeds meer aandacht, vooral uit regelgevingstechnisch oogpunt. In dit dossier leggen we uit hoe deze technieken werken, op welke punten ze verschillen van algemeen aanvaarde methoden en wat hun voordeel is ten opzichte van de traditionele veredelingstechnieken.

Feiten en cijfers

Alle gewassen die we vandaag kennen, zijn het resultaat van menselijke selecties en tussenkomsten.

Om landbouwproductie te verduurzamen, leveren we best inspanningen op vlak van teeltmethode en op vlak van gewasveredeling. Het ene is complementair met het andere.

Alle gewasveredelingsmethoden - oud en nieuw - zijn gebaseerd op processen die in de natuur voorkomen.

Veredelingstechnieken waarbij gebruik wordt gemaakt van straling of chemische stoffen hebben in de voorbije tachtig jaar geleid tot meer dan 3000 gewasvariëteiten die we bijna dagelijks consumeren.

Gewassen aanpassen aan onze behoeften is niet nieuw. Het is bijgevolg fout om te denken dat we met moderne veredelingstechnieken plots de stap maken van "natuurlijke planten" naar "laboratoriumplanten".

Het is essentieel dat nieuwe gewassen geëvalueerd worden op basis van hun nieuwe kenmerken, niet op basis van de veredelingsmethode waarmee ze genetisch aangepast zijn.



Genetica en potgrond

De overgang van jagen en verzamelen naar de landbouw is zonder twijfel een van de meest ingrijpende veranderingen geweest in het bestaan van de mensheid. In plaats van te wachten op goede omstandigheden om voedsel te verzamelen, heeft de mens de touwtjes in handen genomen. Door het selecteren en kruisen van planten en fokken van dieren werden deze langzaam maar zeker aangepast aan onze behoeften. Natuurlijke ecosystemen werden omgeploegd, bemest en geïrrigeerd. Kortom, een streven naar optimalisering van zowel genetische kenmerken als groeiomstandigheden.

Meer en beter voedsel

Erfelijk materiaal van planten wijzigen is helemaal niet nieuw of wereldschokkend. Ingrijpen in de genetica van planten (maar ook van dieren) doen we sinds het ontstaan van de landbouw, zij het grotendeels onbewust. Het moment dat de mens planten uit hun natuurlijke ecosysteem haalde en in een veld plaatste, kan gezien worden als de allereerste stap in een selectie die door de mens werd gestuurd. Die stap heeft uiteindelijk geleid tot onze moderne landbouwgewassen. Niet de kleine of ongezonde planten werden gekozen, maar de grootste en gezonde planten werden geselecteerd. Deze planten kregen extra aandacht: er werd water gegeven in droge periodes, het land werd bemest en onkruiden en plagen bestreden. De gewassen in het veld kregen dus hulp van de mens. Vandaag wordt nog steeds op die manier aan landbouw gedaan, zij het op een minder primitieve manier.

De gemene deler tussen de landbouw van vroeger en die van vandaag is de kunstmatig gecreëerde situatie. De wet van de sterkste geldt niet meer. De natuurlijke selectie wordt ondergeschikt gemaakt aan de menselijke selectie en die kent maar één wet: zo veel mogelijk aangepast zijn aan de menselijke behoeften. Alle gewassen die we vandaag kennen, hebben we te danken aan menselijke selecties en tussenkomsten. Generatie na generatie werd deze werkwijze gebruikt om tot beter en meer voedsel te komen. De beste planten in het veld werden geselecteerd en de zaden werden apart gehouden om als zaaizaad te gebruiken aan het begin van een volgend teeltseizoen. Spontane wijzigingen (mutaties) in het DNA deden zich hierbij voor. Dat gebeurde in de vroegere landbouw en doet zich ook voor in de huidige landbouw. Deze mutaties kunnen te

wijten zijn aan foutjes tijdens het vermeerderen van het DNA tijdens de celdeling of kunnen ontstaan onder invloed van straling, bijvoorbeeld van de zon. Niet elke wijziging aan de DNA-sequentie leidt echter tot nieuwe eigenschappen. In de meeste gevallen verandert er helemaal niets aan de uiterlijke kenmerken van een organisme. Maar in bepaalde situaties kunnen wijzigingen in het DNA resulteren in nieuwe voordelige of nadelige eigenschappen. Deze veranderingen werden ook opgemerkt door onze voorouders. Er werd geselecteerd voor deze nieuwe eigenschappen als ze interessant waren om op die manier gewassen te creëren met maximale voordelen voor de mens. De grote verscheidenheid in de huidige kolenfamilie is hier een mooi voorbeeld van. Alle kolen (bloemkool, spruitjes, boerenkool, broccoli, etc.) zijn door spontane mutaties ontstaan uit dezelfde koolachtige voorouder. Het uitzicht van een bloemkool bijvoorbeeld, wordt bekomen door slecht één verandering in één gen; het bloemkoolgen. Wanneer dit gen in andere planten wordt uitgeschakeld, krijgen ook hun bloemen een bloemkoolachtig uitzicht.¹

Eenzelfde, meer ingewikkeld proces dat zich over verschillende duizenden jaren voltrok, geldt voor maïs. Het gewas dat reeds 35 jaar volop geteeld wordt op de Vlaamse en Nederlandse velden en dat wereldwijd op meer dan 180 miljoen hectare geteeld wordt,² is afkomstig van teosinte. Deze plant is van Mexicaanse en Midden-Amerikaanse origine en lijkt weinig op de maïs die we kennen.³ Zo heeft teosinte zijvertakkingen waardoor het in vergelijking met maïs meer struikachtig is. Waar de aren van teosinte tussen de vijf en twaalf korrels bevatten, omgeven door een harde beschermende laag, bestaat de kolf van moderne maïs uit vijfhonderd of meer onbeschermd korrels.³ Teosinte laat bij rijping zijn zaden los, zodat





die zich gemakkelijker kunnen verspreiden; een van de noodzakelijke elementen in een goede overlevingsstrategie. Een verandering in het teo-sinte-DNA waardoor de korrels blijven vastzitten aan de centrale as van de kolf, zou nooit succesvol zijn in het wild en zou door het natuurlijke selectieproces snel uit de populatie verdwijnen. Voor de mens is dit echter een zeer gunstig kenmerk, want als de korrels loslaten terwijl het gewas nog op het veld staat, gaat een deel van de oogst verloren. Tegen de natuurlijke selectie in, zitten de korrels van alle moderne maïsrassen stevig vast in de kolf. Hetzelfde geldt voor alle andere graan-gewassen zoals tarwe, gerst en rijst.

Naast het ontwikkelen van nieuwe variëteiten (bv. de diversiteit van kolen) en interessante kenmerken (bv. het vasthouden van zaden in de aren) probeerde de mens ook de opbrengst te verhogen. Eerst teelttechnisch door de gewassen te beschermen tegen vraat, overwoekering door onkruiden en aanvallen van insecten, later via plantenveredeling. Het was een moeilijk en langzaam leerproces, waardoor het duurde tot het midden van de vorige eeuw vooraleer een groot deel van de bevolking zekerheid kreeg over de beschikbaarheid van voedsel. Daarvóór was voedseltekort eerder regel dan uitzondering. Tot voor de tweede wereldoorlog was het bijvoorbeeld lang niet vanzelfsprekend om meer dan één keer per week vlees te eten.

De meest opmerkelijke verbetering van de voedselproductie hebben we te danken aan de zogenoemde 'Groene Revolutie'; een periode (1960-1980) die gekenmerkt werd door de opkomst van meststoffen, gewasbeschermingsproducten en irrigatietechnieken en die samenviel met de ontwikkeling van plantvariëteiten die optimaal reageerden op de meststoffen.⁴ De focus



lag vooral op tarwe en rijst, de twee belangrijkste voedselgewassen. In beide gevallen werd veredeld naar minder hoge variëteiten. Dit lijkt een paradox maar dwerg-rassen met korter stro investeren meer energie in graanproductie en minder in bladmateriaal. Met bijkomende hulp van bemesting en irrigatie kon de opbrengst van zowel tarwe als rijst verdubbeld worden in slechts 20 jaar tijd. Dit was ook nodig (vooral in Azië) om de toenemende bevolking van voedsel te kunnen voorzien.

Stilstaan is achteruit gaan

De gewassen die we vandaag telen zijn niet meer te vergelijken met hun voorouders. Door optimalisering van de genetische kenmerken van

plantenrassen aan de omgevingsomstandigheden maar ook door de immense kennis over gewasbescherming, bemesting en teelttechnieken, produceren de geïndustrialiseerde landen vandaag meer dan genoeg voedsel. Toch is het verder veredelen van gewassen meer dan ooit belangrijk. Hoe komt dat?

Wereldwijd staat de landbouw voor grote uitdagingen. Ten eerste wordt het klimaat wispelturiger. Door droogte of overvloedige regenval wordt het in bepaalde landbouw-actieve regio's stilaan onmogelijk om het land efficiënt te bebouwen. Maar ook kleine temperatuurstijgingen kunnen een grote impact hebben op de opbrengsten van bepaalde gewassen. Zo kunnen de tarwe- en gerstopbrengsten in Europa in 2040 tot 20% la-

ger liggen als gevolg van de klimaatopwarming. Maar ook in andere landbouwproductieve regio's van de wereld zoals Noord-Amerika, Zuid-Amerika en Azië worden dalingen in voedselproductie verwacht.⁵ Willen we de voedselproductie in deze regio's op peil houden dan is het nodig dat kwekers anticiperen en nieuwe rassen veredelen die beter aangepast zijn aan hogere temperaturen en/of periodes van droogte.

Ten tweede moeten we de impact van de landbouw op mens en milieu verkleinen. Dit kan door op een andere manier te bemesten. Daarnaast garandeert een verminderd gebruik van pesticiden de veiligheid van boer en consument en spaart het nuttige insecten. Pesticiden en bemesting liggen echter aan de basis van onze hedendaagse voedselproductie. Deze twee pijlers van vandaag op morgen wegnemen, betekent sowieso een kleinere voedselproductie. Ook hier is een grote rol weggelegd voor de toekomstige plantenveredeling. Natuurlijke resistentiemechanismen tegen schimmels, bacteriën, insecten, etc. kunnen ingebouwd worden in onze moderne en hoogrenderende gewassen, wat hun afhankelijkheid van gewasbeschermingsmiddelen verkleint. Het genetisch aanpassen van planten kan er ook voor zorgen dat ze efficiënter met water en bemesting omspringen.

Een derde uitdaging is de toenemende levensstandaard met een stijgende vraag naar vlees. De omzetting van plantaardig eiwit in veevoeder naar dierlijk eiwit in vlees verloopt uiterst inefficiënt. Zo is er dubbel zoveel plantaardig voeder nodig voor de productie van één kilogram kippenvlees en is er zes kilogram veevoeder nodig voor één kilogram varkensvlees. De productie van plantaardige eiwitten zal bijgevolg opgevoerd worden in bepaalde regio's.

De bovenvermelde uitdagingen laten zien dat er door de klimaatsverandering minder land beschikbaar zal zijn voor landbouw en dat verminderd gebruik van bemesting en pesticiden zal zorgen voor minder beschermde oogsten. Toch zal er door de toenemende bevolking en welstand meer geproduceerd moeten worden, vooral dierlijke eiwitten.

Een geïntegreerd landbouwmodel

Bovenstaand scenario kan enkel aangepakt worden door het introduceren van een geïntegreerd landbouwmodel. Dat betekent een combinatie van het beste uit de conventionele landbouw en de beste ecologische inzichten uit de biologische landbouw, en dit gebruikmakend van de allernieuwste technologieën en inzichten. Dit kan zich voltrekken zowel op vlak van teeltwijze als genetica van plantenrassen.

Dit dossier behandelt de verschillende methoden waarmee de mens sinds jaar en dag de genetische kenmerken van gewassen heeft aangepast. Ook nieuwe technieken die recenter hun ingang vonden of die in de toekomst zullen gebruikt worden komen aan bod. We besteden hierbij extra aandacht aan een reeks nieuwe veredelings technieken – de zogenaamde *New Breeding Techniques* (NBT) die in het kader van de GGO-discussie extra politieke en publieke aandacht krijgen. Door in dit dossier enkel plantenveredeling te behandelen, willen we geen afbreuk doen aan de waarde van teelttechniek en teeltinzichten. Het is een minstens even belangrijk aspect in het verhogen en verduurzamen van onze voedselproductie en gaat hand in hand met plantenveredeling.



2 Plantenveredeling tot het jaar 2000

Tot het begin van de 20^{ste} eeuw was plantenveredeling vooral een onbewust selectieproces waarbij zaad of knollen van de best aangepaste gewassen bewaard werden voor het volgende jaar. Na de herontdekking van de wetten van Mendel kreeg veredeling een theoretische basis. Gerichte kruisingen en selectie zorgden voor een versnelling van het veredelingsproces. Deze basismethode werd opgevolgd door nieuwe technieken om extra eigenschappen te creëren en om kenmerken over de soortgrenzen heen uit te wisselen.

Selecteren, kruisen en selecteren

Uiterlijke kenmerken van plant, dier en mens worden grotendeels bepaald door de informatie die opgeslagen is in het DNA. Vermits DNA overgedragen wordt van ouders naar nakomelingen zijn veel uiterlijke kenmerken erfelijk bepaald. Dit inzicht, vandaag voor iedereen parate kennis, hebben we onder andere te danken aan Gregor Mendel. In een Tsjechische abdij kruiste Mendel erwten met verschillende bloemkleur. Hij ontdekte dat specifieke eigenschappen van de ouders niet willekeurig aan de volgende generatie worden doorgegeven, maar daarentegen bepaalde wetmatigheden volgen. De bevindingen van Mendel openden een nieuwe wereld in de plantenveredeling en vormden de basis voor de wereldbekende erfelijkheidswetten die zijn naam dragen.

Kruisen maakt gebruik van geslachtelijke voortplanting. Bij gerichte kruisingen wordt stuifmeel van de ene ouderplant aangebracht op de stamper van een bloem van de andere ouderplant. Door twee specifieke planten te kruisen kan een welbepaalde eigenschap van de ene plant (bv. ziekte-ongevoeligheid) met een eigenschap van de andere plant (bv. een hoge opbrengst) gecombineerd worden in de nakomelingen. Kruisen speelt ook een zeer grote rol in het creëren van variatie aangezien ieder product van een kruising een unieke combinatie bezit van het DNA van vader en moeder. Bovendien gebeuren er tijdens de vorming van de geslachtscellen bijkomende herschikkingen in het DNA, zodat nieuwe eigenschappen kunnen ontstaan in het nageslacht. De geslachtelijke voortplanting is dé sleutel tot het succesvol handhaven van een bepaalde soort. Een soort krijgt op die manier immers de mogelijkheid om zich na verloop van tijd, of beter na verloop van generaties, aan te passen aan

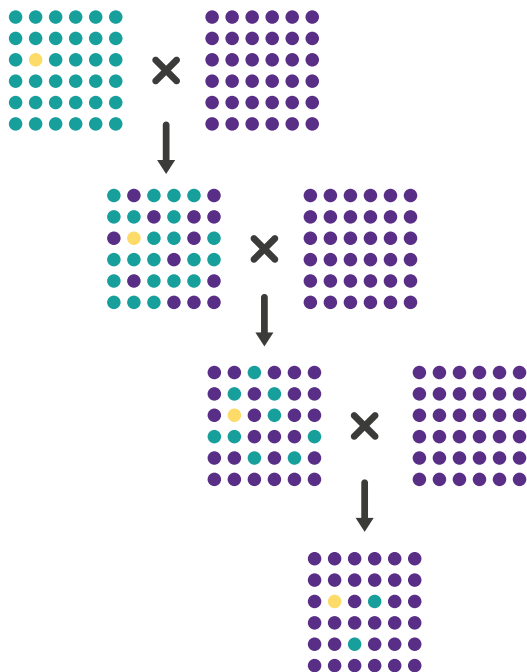
veranderende omgevingsomstandigheden. De grote rijkdom aan gewassen die we rechtstreeks of onrechtstreeks gebruiken voor onze voeding, hebben we voornamelijk te danken aan kruisingsprogramma's. Vele nieuwe rassen werden ontwikkeld dankzij kruisingen en de combinatie van kruisen en selecteren zal een hoeksteen blijven in alle veredelingsprogramma's.

Ondanks dat kruisen berust op een van de meest natuurlijke processen, namelijk voortplanting, zouden vele kruisingsproducten nooit ontstaan zijn zonder tussenkomst van de mens. De aardbei is hiervan een mooi voorbeeld. De moderne aardbei is ontstaan in de plantentuin van Versailles, uit een kruising tussen een smaakintense maar kleine aardbei uit de Verenigde Staten en een aardbei uit Chili met grotere vruchten.⁶ Zonder hulp van de mens hadden deze planten nooit een nieuwe variëteit kunnen voortbrengen.

De wetenschappelijke basis van de erfelijkheidswetten heeft het mogelijk gemaakt om sneller en directer dan voorheen gunstige eigenschappen van verschillende ouderplanten bij elkaar te brengen. Maar kruisen als veredelings techniek heeft beperkingen. Een kweker weet op voorhand niet welke informatie er doorgegeven wordt aan de nakomelingen. Deze vorm van plantenveredeling is wat men noemt 'gissen en missen' of 'trial-and-error'. Men selecteert ouders met interessante eigenschappen, de planten worden gekruist en de kweker hoopt dat zoveel mogelijk interessante kenmerken gecombineerd zijn in bepaalde nakomelingen. Door planten te kruisen wordt de helft van het moeder-DNA gecombineerd met de helft van het DNA van de vader, maar welke 50% is niet gekend. Bovendien worden bepaalde eigenschappen vaak samen doorgegeven. Bij een kruising kan het dus gebeuren dat met een gewenste eigenschap ook niet-gewenste eigenschappen (bv.

productie van toxische stoffen zoals alkaloiden) naar het nageslacht overgedragen worden of dat interessante kenmerken ongewild verloren gaan. Na kruisen moet dus veel geselecteerd worden en soms verder gekruist worden. Om ongewenste eigenschappen kwijt te raken, kan het kruisingsproduct vele malen opnieuw gekruist worden met de ouder die de ongewenste kenmerken niet heeft. Dit principe wordt terugkruisen genoemd (Figuur 1). Een nieuw ras ontwikkelen met behulp van kruisingen is met andere woorden een werk van lange adem. Het duurt ruim tien jaar om na het maken van de eerste kruising een nieuw ras op het veld te hebben. Voor sommige kenmerken en sommige gewassen kan dit oplopen tot 40 jaar.

Figuur 1. Een schematisch voorbeeld ter illustratie van een (terug)kruisingschema dat de overdracht van een interessant kenmerk (voorgesteld als blauwe stippen) beoogt terwijl zo veel mogelijk ongewenste kenmerken (voorgesteld door blauwe stippen) verwijderd worden uit het kruisingsproduct.



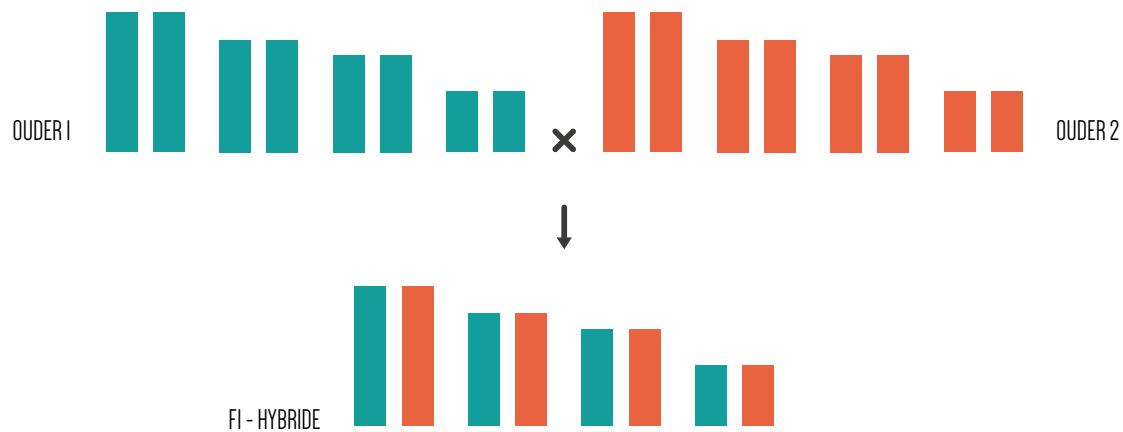
Een tweede beperking van het kruisen is dat men gebonden is aan geslachtelijke voortplanting. Hier-

door kan met behulp van kruisingen enkel erfelijke informatie uitgewisseld worden (en vruchtbare nakomelingen verkregen worden) tussen individuen van eenzelfde soort. Een tomaat (*Solanum lycopersicum*) kan enkel gekruist worden met een tomaat. Een beschermingsmechanisme tegen een schimmel aanwezig in een andere soort, zoals paprika (*Capsicum annuum*) kan met behulp van kruisen niet overgebracht worden naar tomaat. Dat is de biologische definitie van een soort. Er is echter ook een taxonomische definitie op basis van uiterlijke kenmerken en DNA-sequentie. Hierdoor zijn individuen soms in een aparte taxonomische soort onderverdeeld terwijl ze toch vruchtbare nakomelingen kunnen krijgen. Koolzaad is daar een voorbeeld van. Deze soort (*Brassica napus*) is ontstaan uit een kruising tussen de soorten *Brassica rapa* en *Brassica oleracea*.^{7,8} Maar ook onze moderne aardappel (*Solanum tuberosum*) kan in sommige gevallen vruchtbare nakomelingen vormen met wilde aardappelsoorten zoals *Solanum demissum*.

F1-hybriden: 1+1=3

In de continue zoektocht naar beter presterende gewassen bewandelde de plantenveredeling ook andere paden. Rond 1930 werd de meerwaarde van F1-hybriden ontdekt. Een F1-hybride is het kruisingsproduct van twee ouderlijnen die via inteelt verkregen werden. De hybridetechnologie combineert dus inteelt met kruising. De methode is standaard bij maisveredeling en ook de meeste groentezaden die vandaag verkocht worden zijn F1-hybriden.

In een eerste stap worden inteeltfamilies gemaakt door zelfbestuiving; het stuifmeel van een bepaalde plant wordt op de eigen stamper(s) overgebracht. Hierdoor worden eigenschappen vastgelegd in homogeen erfelijk materiaal, de homozygote vorm genoemd. Gewassen hebben van



Figuur 2. Om een F1-hybride te ontwikkelen start men van 2 ouders die van ieder chromosoom 2 identieke exemplaren hebben. In de illustratie zijn telkens 2 kopijen van 4 chromosomen voorgesteld. Blauw wijst op de moeder, oranje op dat van de vader. Alle nakomelingen van deze ouders zijn identiek aan elkaar en hebben van ieder chromosoom 2 verschillende versies.

ieder gen twee of meerdere kopijen. Homozygoot wil zeggen dat alle kopijen genetisch identiek zijn. Dit wordt vaak aangeduid met letters van dezelfde grootte, bv. AA of aa. Een situatie waarbij een gen voorkomt in twee alternatieve vormen wordt dan heterozygoot genoemd en aangeduid met Aa. Eens de inteeltfamilies gevormd zijn, worden ze gekruist met elkaar. De families worden zo gekozen dat ze uiteenlopende positieve eigenschappen hebben die elkaar aanvullen. Om dit simpel en schematisch te illustreren kan voor de eigenschappen A, B, C en D de inteeltmoeder voorgesteld worden door AABBccdd en inteeltvader door aabbCCDD. Door beide ouders te kruisen zijn alle nakomelingen – de F1-hybriden –

genetisch identiek, namelijk AaBbCcDd (Figuur 2). Dit zorgt voor een uniformiteit in het zaad en een gelijkmatig groeiend gewas, wat een zeer interessant kenmerk is voor de landbouwer omdat het mechanisatie (bijvoorbeeld bij de oogst) eenvoudiger maakt. Bijkomend hebben de F1-hybriden alle eigenschappen in heterozygote toestand (AaBbCcDd). Hierdoor bezitten F1-hybriden in de meeste gevallen een hybride-groeikracht of heterosis. Dit is het effect dat de nakomeling beter presteert dan het gemiddelde van beide ouders voor een of meerdere eigenschappen (Figuur 3).⁹ Planten die ontstaan uit een kruising van twee verschillende inteeltlijnen ontwikkelen zich fors en geven een hogere opbrengst. Maar niet alle



Figuur 3. Illustratie van de hybride-groeikracht of het heterosis-effect. F1-hybriden hebben een extra groeikracht en opbrengst in vergelijking met hun ouders.

© Planten in het veld: met dank aan Jun Cao, Schnable Lab, Iowa State University
Maïskolven: met dank aan Ruth Swanson-Wagner, Schnable Lab, Iowa State University

inteehtlijnen zijn even geschikt voor het maken van een hybride. Via proefkruisingen moet eerst uitgezocht worden welke combinaties van inteehtlijnen een goed resultaat geven. Algemeen geldt dat hoe meer de kruisingsouders genetisch van elkaar verschillen hoe groter het heterosis-effect is. Het nadeel van F1-hybriden voor de landbouwer is dat de prestaties afzakken in volgende generaties en dat het heterosis-effect na een aantal generaties volledig verdwenen is. De nakomelingen van F1-hybriden zijn ook niet meer uniform. Ze hebben een wisselend uiterlijk en kwaliteit waardoor de landbouwer genoodzaakt is om ieder jaar nieuw F1-zaad aan te kopen, wil hij dezelfde productiviteit behouden. Dit is vanzelfsprekend een voordelige eigenschap voor veredelaars en zaadbedrijven.

Kruisen van onkruisbare soorten

Een volgende stap in de geschiedenis van de plantenveredeling was het opzetten van kruisingen tussen verwante soorten. Volgens de biologische definitie van een soort (zie p12) is dit op natuurlijke manier niet mogelijk. Zo kunnen bepaalde planten samen geen nakomelingen produceren omdat het aantal chromosomen van de ouders niet gelijk is, de pollenkorrels niet tot bij de eicellen geraken of het gevormde embryo niet kan ontwikkelen tot zaad. Door de opkomst van weefselteelttechnieken halfweg de 20ste eeuw konden sommige van deze barrières omzeild worden.¹⁰ Weefselteelt ook wel *in vitro*-teelt genoemd, is een methode om planten te laten groeien en vermeerderen onder steriele omstandigheden. De cellen, weefsels of volledige planten groeien op kunstmatige voedingsbodems in platen of bekalen. Door aan de voedingsbodems chemische stoffen toe te voegen die de deling van plantencellen verhindert, kan het aantal chromosomen van de plant aangepast worden. Ook kunnen plantenembryo's

gered worden door ze uit afstervend zaad te halen en te laten groeien onder gecontroleerde omstandigheden in aanwezigheid van de nodige voedingsstoffen.

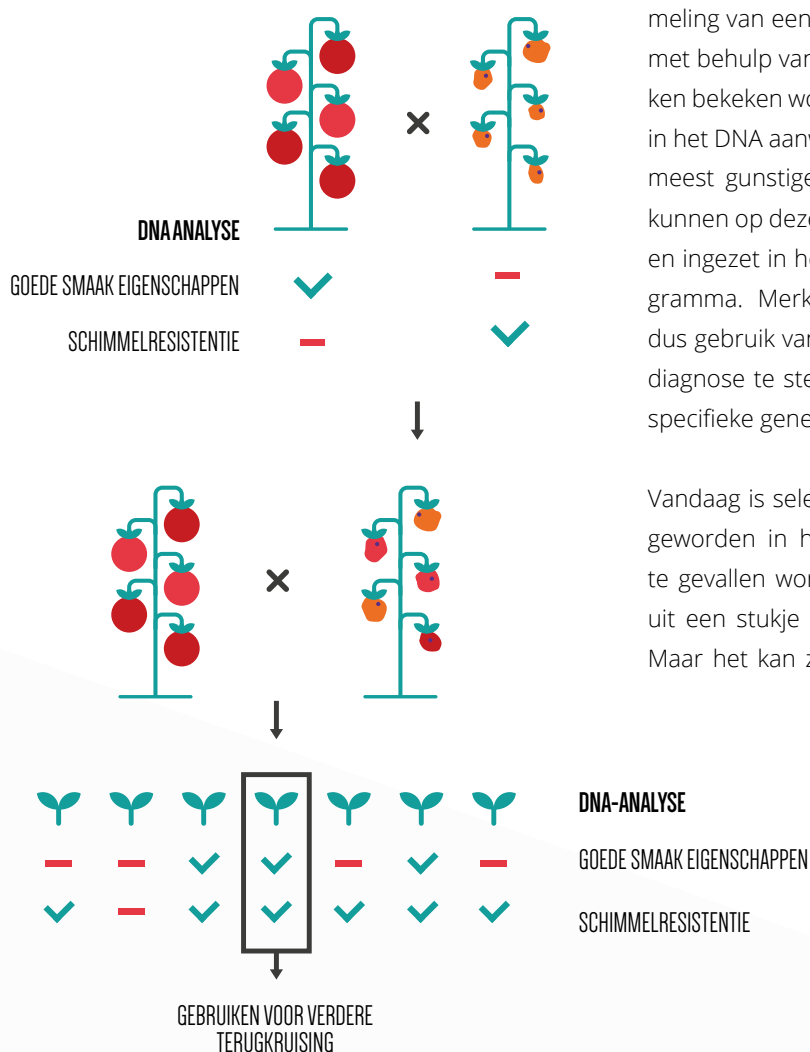
Midden vorige eeuw werd een kruisingsprogramma opgezet met tarwe (*Triticum durum*) en rogge (*Secale cereale*). De bedoeling was dat het kruisingsproduct de hogere opbrengst en betere graankwaliteit van tarwe zou combineren met de mindere gevoeligheid voor schimmelziekten van rogge. De twee graansoorten zijn echter genetisch te ver van elkaar verwijderd om nog spontaan nageslacht te kunnen voortbrengen. Door gebruik te maken van allerlei technieken, zoals het verdubbelen van chromosomen met behulp van chemicaliën en het opgroeien van plantembryo's *in vitro*, slaagde men er uiteindelijk in om een kruisingsproduct te verkrijgen. Het gewas werd triticale gedoopt. Triticale is een gewas dat zonder toedoen van de mens nooit bestaan zou hebben. Tot op vandaag is nog altijd niet geweten hoe drastisch het DNA herschikt is geweest tijdens de ontwikkeling van triticale en welke tarwe-rogge-DNA-combinaties er zijn ontstaan. Het is een gewas dat bij ons sinds de jaren 1970 in het veld staat en voornamelijk gebruikt wordt als veevoeder. Wereldwijd wordt een kleine 15 miljoen ton triticale geproduceerd op bijna vier miljoen hectare.²

Selectie met markers

Het meeste werk in kruisingsprogramma's gaat naar selectie. Bepaalde eigenschappen zoals ziekteresistentie kunnen niet zomaar op basis van het uiterlijk van de plant geëvalueerd worden. Daarvoor moet de ziekte eerst in het veld zitten. Dat is niet altijd het geval waardoor veredelaars

vaak hun kruisingsproducten doelbewust moeten infecteren om de meest ongevoelige planten uit de populatie te kunnen selecteren. Naast de aan- of afwezigheid van een bepaalde eigenschap-relatief gemakkelijk te selecteren tijdens een veredelingsprogramma – zijn er ook kwantitatieve eigenschappen zoals opbrengst of groeisnelheid. Deze kwantitatieve eigenschappen worden vaak bepaald door verschillende genen, wat de veredeling veel lastiger en vooral ook tijdrovender maakt.

Door de toenemende kennis over de functie



van plantengenen en hun rol in plantengroei en -ontwikkeling is van een groot aantal kenmerken gekend welk DNA hiervoor verantwoordelijk is. Door een specifiek DNA-fragment (ook wel merker genoemd) op te sporen in een kruisingsproduct kan in een zeer vroeg stadium bepaald worden of het bijvoorbeeld ziekteresistent zal zijn zonder dat men de plant moet infecteren. Kruisingsprogramma's kunnen dus veel efficiënter gemaakt worden door de selectie uit te voeren op DNA-niveau in plaats van op uiterlijk. Dit is mogelijk wanneer de genen die direct van invloed zijn op een bepaalde eigenschap, bekend zijn of wanneer naburige genen bekend zijn. Voor iedere nakomeling van een bepaalde kruising kan vervolgens met behulp van moleculaire DNA-merkertechnieken bekeken worden welke combinatie van genen in het DNA aanwezig is.¹¹ De nakomelingen die de meest gunstige combinatie van genen bezitten, kunnen op deze manier snel worden opgespoord en ingezet in het vervolg van het veredelingsprogramma. Merker-gebaseerde veredeling maakt dus gebruik van biotechnologische kennis om de diagnose te stellen over aan- of afwezigheid van specifieke genen (Figuur 4).

Vandaag is selectie met merkers bijna standaard geworden in het veredelingswerk. In de meeste gevallen wordt het te analyseren DNA bereid uit een stukje bladweefsel van een jonge plant. Maar het kan zelfs in een nog vroeger stadium.

Figuur 4. Illustratie van merker-geassisteerde veredeling. Een schimmelgevoelige tomatenplant met goede smaakeigenschappen (plant met grote rode tomaten) wordt gekruist met een schimmelresistente maar slecht smakende tomatenplant (plant met kleine oranje tomaten). Met behulp van DNA-analyse kunnen nakomelingen geselecteerd worden op zaailing niveau die zowel schimmelresistent zijn als goed smakende tomaten zullen produceren.

Veredelaars kunnen nu gebruik maken van ‘seed chipping’; een technologie waarbij een klein stukje van het zaad weggenomen wordt om DNA uit te bereiden zonder dat het embryo beschadigd wordt of het zaad aan kiemkracht verliest.¹² Met ‘seed chipping’ kan uiterst vroeg achterhaald worden welke zaden gunstige kenmerken bevatten en moeten de minder geschikte zaden niet eens gezaaid worden. Dit betekent een versnelling van het veredelingsprogramma en een aanzienlijke vermindering van de selectiekosten.

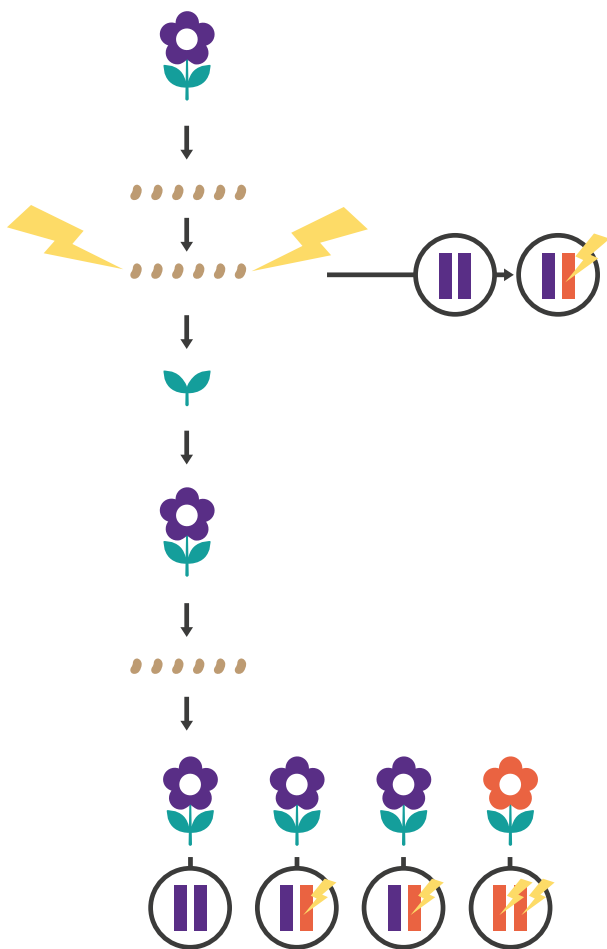
Mutatieveredeling

Aangezien kruisen meestal beperkt blijft tot planten binnen een bepaalde soort, hangt het succes van kruisingswerk af van de hoeveelheid kenmerken die aanwezig is binnen een soort. Hoe groter de genetische variatie binnen een soort, hoe meer mogelijkheden er zijn om interessante kenmerken te vinden en samen te brengen. Plantenveredelaars zijn continue op zoek naar nieuwigheden. Om nieuwe kenmerken te creëren, zijn kruisingen echter niet de aangewezen methode. Met de groeiende kennis van DNA en het belang ervan voor de uiterlijke kenmerken, namen veredelaars het heft in eigen handen. In plaats van te wachten tot er zich spontaan mutaties in het DNA voordoen (en zo nieuwe eigenschappen te krijgen), ging men rond de jaren 1930 over naar de mutatie-veredeling.^{13,14} Met deze soort veredeling kunnen veranderingen in het DNA van planten met een veel hogere frequentie aangebracht worden. Alleen weet men niet wat en waar er iets zal veranderen.

Rond de overgang van 19de naar 20ste eeuw startten wetenschappers experimenten op om erfelijk materiaal te veranderen met behulp van X-stralen. Eerst met fruitvliegen omwille van wetenschappelijke doeleinden, later met gewassen

voor de toepassingen.¹⁵ Waar de natuurlijke mutatiefrequentie ongeveer een op 100 miljoen nucleotiden (letters van de DNA-code) is, kunnen straling en chemische stoffen zoals ethyl-methaansulfonaat (EMS) – afhankelijk van de intensiteit en de concentratie – deze frequentie opdrijven tot een op duizend. De veranderingen kunnen subtiele wijzigingen in de DNA-code zijn – zoals dat meestal het geval is bij natuurlijke mutaties – maar veelal zijn de veranderingen drastischer, zoals grote herschikkingen in het DNA of het verwijderen van volledige DNA-fragmenten. Door bestraling kunnen er gemakkelijk duizenden dergelijke veranderingen veroorzaakt worden, waarvan er slechts één of enkele nuttig kunnen zijn. Het kan vergeleken worden met een hagelschot. Een paar hagelkorreltjes kunnen een gewenst effect hebben, maar waar de rest naar toe gaat en wat ze veroorzaken, is een groot vraagteken. Ook hier is het gissen en missen of trial-and-error.

Er werden grootschalige initiatieven genomen om zaden te bestralen in radio-actieve velden (“gamma-gardens”) of te behandelen met EMS met als doel wijzigingen te veroorzaken in het DNA (Figuur 5). Zaden werden ook meegenomen in de ruimte om ze bloot te stellen aan kosmische straling.¹⁵ Deze zaden met willekeurige DNA-verstoringen werden vervolgens uitgezaaid in de hoop dat er specifieke nieuwe kenmerken ontstonden. Naast tal van nieuwe rijst- en banaanvariëteiten die in grote hoeveelheden worden geteeld en geconsumeerd, is ook de roze pompelmoes een gekend product van deze methode.¹⁶ Ook de durumtarwe die gebruikt wordt om spaghetti te maken, verkreeg kenmerken door mutatieveredeling. Met behulp van mutatieveredeling zijn er de voorbijge



Figuur 5. Illustratie van mutatieveredeling. Zaden van een plant met paarse bloemkleur worden behandeld met mutagene producten waardoor mutaties in het DNA ontstaan. Deze mutaties kunnen in volgende generaties tot uiting komen en aanleiding geven tot bv. een rode bloemkleur.

tachtig jaar meer dan drieduizend gewasvariëteiten gecreëerd.^{17,18} Op regulatorisch vlak wordt geen onderscheid gemaakt tussen gewassen die kenmerken verkregen via mutatieveredeling en klassieke kruisingsproducten. Producten afkomstig van mutatieveredeling moeten ook niet gelabeld worden.

Genetische modificatie

Al honderden jaren is de mens op zoek naar methoden om nieuwe kenmerken in planten te krijgen of om interessante kenmerken te combineren in een enkel gewas. Het grootste probleem van kruisen blijft de afhankelijkheid van geslachtelijke voortplanting. Eind jaren 1970 werd een technologie ontwikkeld die toelaat om genetische informatie in te bouwen in het DNA van een plant zonder dat er kruisingen nodig zijn. Genetische informatie vanuit paprika of vanuit maïs inbouwen in een tomaat werd plots mogelijk. De methode werd genetische modificatie gedoopt en de producten ervan: genetische gemodificeerde gewassen of GGO-gewassen. De ontwikkeling van de GGO-technologie opende een wereld van nieuwe mogelijkheden net zoals de wetten van Mendel een grote doorbraak in de plantenveredeling veroorzaakten.

Genetische modificatie stelt de wetenschap in staat om doelgericht één of meerdere gewenste eigenschappen toe te voegen aan een bepaalde plant. Als de erfelijke informatie van een plant een software pakket zou zijn dan kan men de GGO-techniek vergelijken met het upgraden van de software: men voegt de genetische code voor een bepaalde eigenschap toe aan de plant. Of, als men een plant zou vergelijken met een smartphone, dan staat het genetisch wijzigen gelijk aan het uploaden van een extra applicatie. Net zoals een smartphone met een extra app nog altijd dezelfde smartphone is, is ook een GGO-plant nog steeds dezelfde plant maar kan die net iets meer. In vergelijking met de eerder besproken veredelingstechnieken, is GGO-technologie meer precies, voorspelbaar en controleerbaar. Bovendien blijven de eigenschappen van het ras dezelfde. Een GGO-Bintje aardappel blijft

een Bintje aardappel, alleen heeft de GGO-vorm een extra eigenschap. Met kruisen daarentegen mengt men vader- en moeder-DNA zo intens dat men een nieuwe variëteit verkrijgt. Vandaag zijn er vier grote GGO-toepassingen beschikbaar: herbicide-tolerantie, insect-resistentie, virus-resistentie en droogte-tolerantie (voor meer informatie zie De GGO-revolutie¹⁹ of de VIB achtergrond dossiers²⁰).

De oorspronkelijke en nog steeds meest efficiënte manier om planten genetisch te wijzigen steunt op het natuurlijk DNA-overdrachtsmechanisme van de bodembacterie *Agrobacterium*. Deze bacterie infecteert in de natuur bepaalde gastheerplanten en bouwt vervolgens een stukje van zijn eigen erfelijk materiaal in het DNA van de plant in. Op dat stukje bacterieel DNA ligt de informatie voor de productie van stoffen waar de bacterie zich mee kan voeden alsook voor de productie van plantenhormonen waardoor de geïnfecteerde cellen vermenigvuldigen. Dit ingewikkeld biologisch proces werd tijdens de late jaren '70 ontrafeld door de onderzoeksgroepen van Jef Schell en Marc Van Montagu aan de Universiteit Gent.²¹ De onderzoekers zagen onmiddellijk in dat *Agrobacterium* eigenlijk een transporteur is van DNA. Ze verwisselden het stukje bacterieel DNA (dat *Agrobacterium* normaal inbouwt in planten-DNA) met de genetische informatie van een landbouwkundig interessante eigenschap. Na infectie van het plantenmateriaal met de genetisch gewijzigde *Agrobacterium*-stam merkten ze op dat *Agrobacterium* op dezelfde manier deze informatie in het planten-DNA inbouwde (Figuur 6). De eerste genetisch gewijzigde plant werd ontwikkeld in Gent in 1982. Het was een tabakspplant, tolerant gemaakt voor een herbicide.

Naast deze biologische manier bestaat er ook

een mechanische manier om DNA in planten binnen te brengen. De belangrijkste is de '*particle acceleration*' methode, soms ook wel '*particle bombardment*' of het 'genenkanon' genoemd. Hiervoor worden minuscule goudbolletjes bedekt met het DNA dat men in de plant wilt introduceren. Die goudbolletjes worden vervolgens onder hoge druk in het plantenweefsel 'geschoten'. Het DNA dringt in sommige gevallen door tot in de celkern waar het in een aantal gevallen spontaan ingebouwd wordt in het DNA van de plant. In vergelijking met *Agrobacterium* laat deze methode meer aan het toeval over, is minder efficiënt en in vele gevallen worden slechts stukken van het gewenste DNA in het planten-DNA ingebouwd, dikwijls in een groot aantal herhalingen. Om planten genetisch te wijzigen die moeilijk geïnfecteerd kunnen worden door *Agrobacterium* is dit echter nog steeds de meest succesvolle manier.

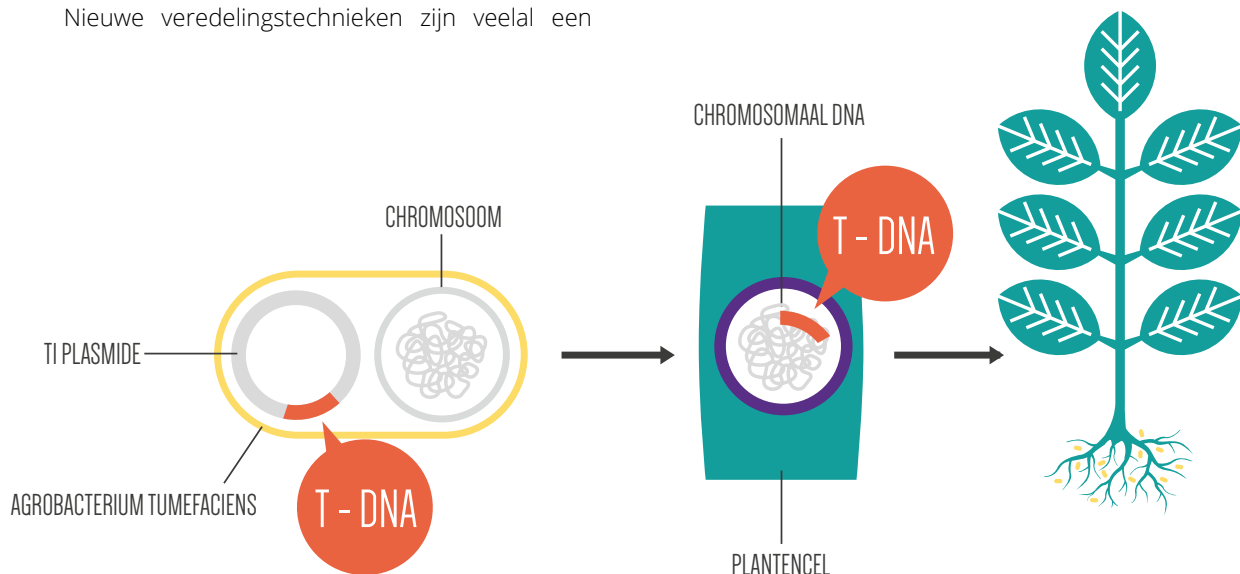
Hoe geraakt men van een genetisch gewijzigde cel naar een genetisch gewijzigde plant? In tegenstelling tot mens en dier, hebben planten de unieke eigenschap dat ze uit één enkele plantencel een nieuwe plant kunnen maken. Wanneer één plantencel genetisch wordt gewijzigd (met *Agrobacterium* of met het 'genenkanon'), kan men hieruit een volledige, genetisch gewijzigde plant laten groeien. Soms gebeurt dit spontaan maar in de meeste gevallen wordt het proces gestuurd door het toevoegen van plantenhormonen die zorgen voor de aanmaak van scheuten en wortels.

De opgesomde veredelingsmethoden in dit hoofdstuk laten zien dat het aanpassen van gewassen aan onze behoeften niet nieuw is. Het is dus met andere woorden niet correct dat we met de GGO-technologie plots de stap maken van



“natuurlijke planten” naar “laboratoriumplanten”. Al sinds het ontstaan van de landbouw heeft de mens planten naar zijn hand gezet en sinds 1900 worden plantenrassen ontwikkeld die nooit zouden ontstaan zijn zonder toedoen van de mens. Nieuwe veredelings technieken zijn veelal een

verbetering van bestaande methoden waarbij het genetisch materiaal van planten op een meer gecontroleerde en bijna chirurgische manier aangepast wordt.



Figuur 6. Schematische voorstelling van het genoverdrachtsmechanisme van *Agrobacterium tumefaciens*. Naast het chromosomaal DNA heeft de bacterie een Ti-plasmide (voorgesteld door grijze cirkel). De genetische informatie vervat in het T-DNA (rood stukje) wordt door *Agrobacterium* overgebracht naar een plantencel waar het ingebouwd wordt in het chromosomaal DNA van de plant. Uit deze genetisch gewijzigde plantencel wordt dan een volledige plant gevormd. Deze plant is identiek aan de oorspronkelijke plant maar heeft een extra stukje genetische informatie.



3 Nieuwe veredelingsmethoden

De GGO-technologie is niet het eindpunt in het aanpassen van gewassen aan onze behoeften. Nieuwe methoden zijn in ontwikkeling om nog doelgerichter in te grijpen in het DNA van planten. Gezien de commotie rond GGO's is de cruciale vraag bij publiek en politiek of deze nieuwe veredelings technieken (*New Breeding Technologies*) GGO-producten opleveren of niet. Echter, de nieuwe veredelings technieken kunnen niet allemaal over dezelfde kam geschoren worden. Ze hebben namelijk heel verschillende werkingsmechanismes en kunnen bijgevolg andere resultaten opleveren, zeker wat betreft regelgeving. Daarom worden de veelbesproken nieuwe veredelingsmethoden hier onderverdeeld in vier verschillende categorieën.

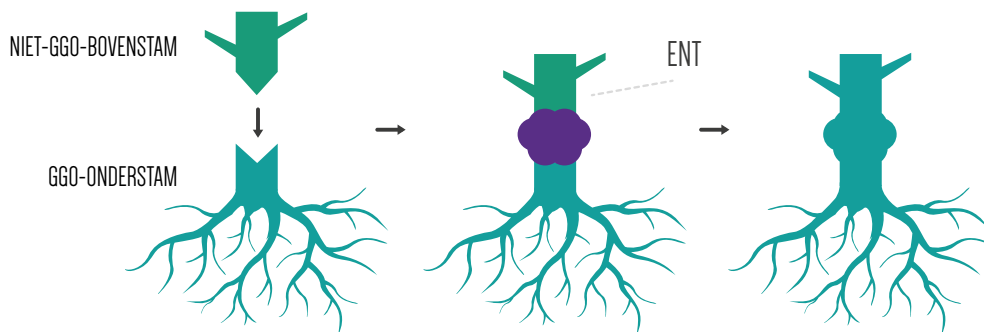
Geen aanpassing van planten-DNA

Enten

Enten is een veelgebruikte techniek waarbij een bovenstam (ent) van de ene plantensoort of -variëteit op een onderstam van een andere soort of variëteit gezet wordt. Deze techniek is bijna standaard in de boomkwekerij. Zo goed als alle rozen zijn enten. Maar ook alle Europese druivelaars zijn enten van een *Vitis vinifera* bovenstam op een *Vitis labrusca* onderstam. *V. Vinifera* is gevoelig voor de druifluus, een insect dat in de bodem voorkomt en waarvan de infecties rond 1870 zo goed als alle Europese wijngaarden hebben vernield.²² In Noord-Amerika werd een soortgenoot gevonden, meer bepaald *V. labrusca* die van nature uit weerstand heeft tegen de druifluus. Aangezien het insect enkel in de bodem zit, was het voldoende om een resistent wortelgestel te hebben. Men heeft dus alle *V. vinifera* druivenvariëteiten – van Pinot noir tot Sauvignon blanc – geënt op een *V. Labrusca* onderstam. Volledig intacte *V. Vinifera* planten komen slechts in specifieke streken in de wereld nog voor, bv. in Chili. Natuurlijke barrières zoals de Stille Oceaan, het Andesgebergte, de Atacama woestijn en Antarctica hebben Chili beschermd tegen de verspreiding van de druifluus.

Het enten op zich is dus allesbehalve een nieuwe techniek. Toch krijgt deze techniek in het kader van de GGO-discussie terug aandacht. Want wat moet op regelgevingstechnisch vlak gebeuren als er een ent gemaakt wordt tussen een niet-GGO-bovenstam en een GGO-onderstam (Figuur 7)? Vallen de vruchten van de niet-GGO-bovenstam onder de GGO-regelgeving? Een wetenschappelijk antwoord is simpel: het DNA van de bovenstam inclusief de vruchten is niet aangepast dus zijn er geen wetenschappelijke argumenten om de vruchten van de bovenstam onder de GGO-regelgeving te laten vallen. Dit wil niet zeggen dat er geen uitwisseling is tussen boven- en onderstam. Naast water, suikers en andere metabolieten kunnen ook kleine moleculen (zoals RNA-moleculen) afkomstig van de GGO-onderstam uitgewisseld worden.²³

Een GGO-plant die als onderstam gebruikt wordt, kan ontwikkeld zijn om de expressie van een of meerdere genen uit te schakelen. Dit gebeurt vaak door de productie van RNA-moleculen. Deze moleculen kunnen getransporteerd naar de bovenstam alwaar ze op een identieke manier de expressie van specifieke genen kunnen beïnvloeden. Dus niettegenstaande het DNA van de bovenstam niet gewijzigd wordt door de onderstam kan de productie van bepaalde eiwitten in de bovenstam toch aangepast worden door de RNA-moleculen uit de onderstam.

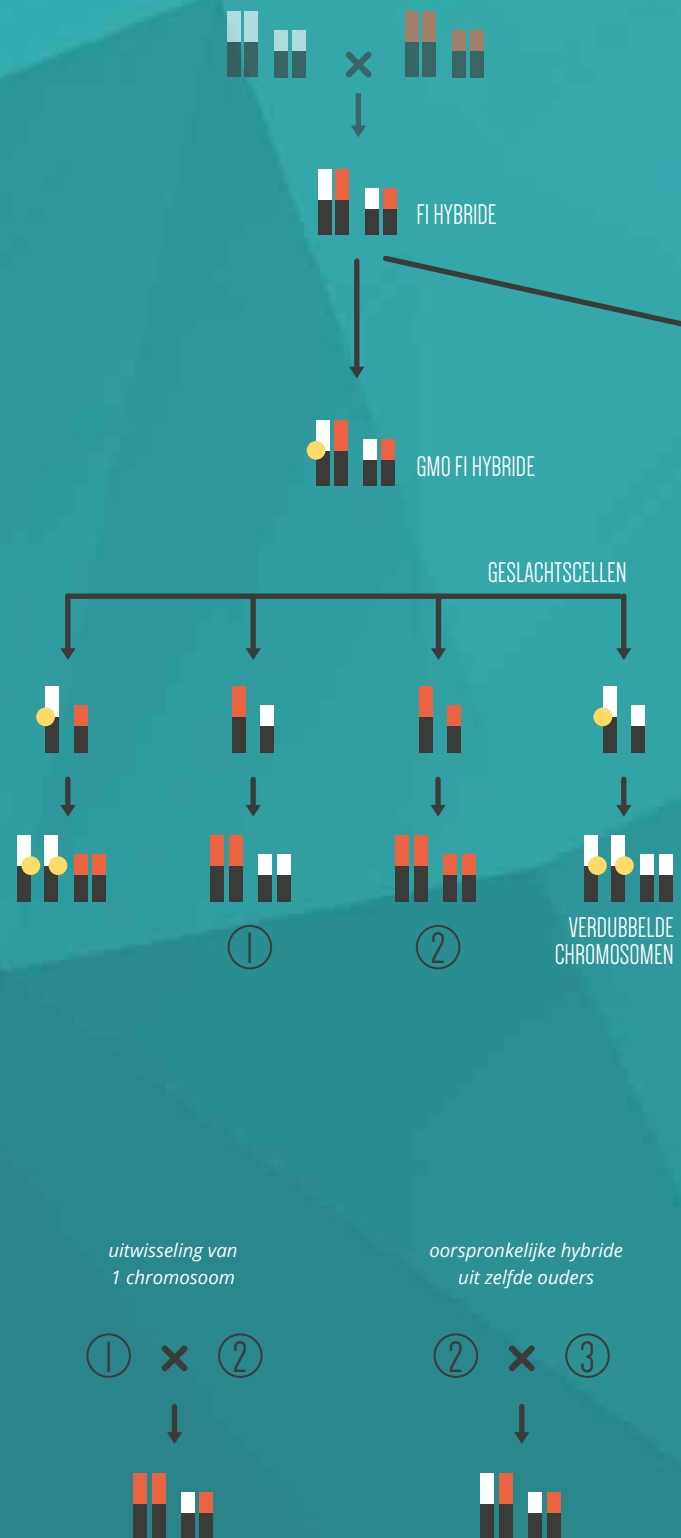


Figuur 7. Een niet-GGO-bovenstam wordt geënt op een GGO-onderstam.

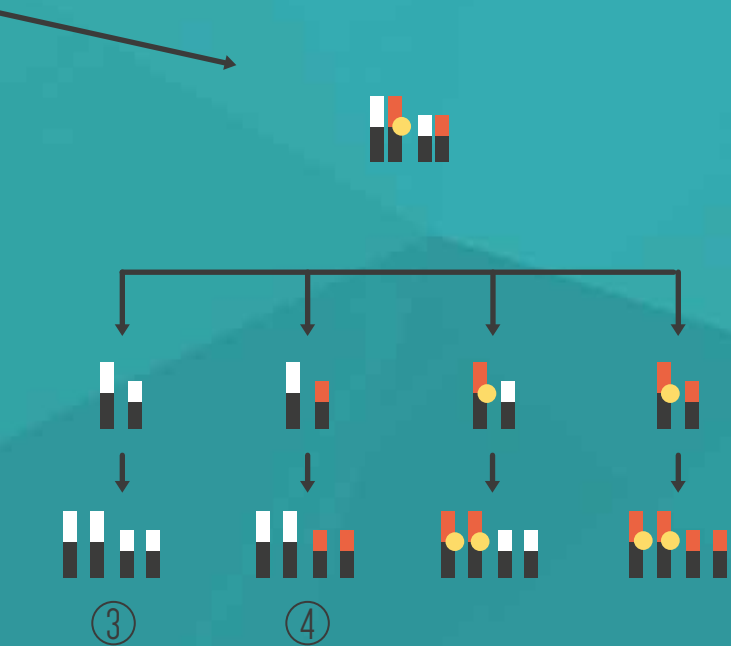
Reverse breeding

Reverse breeding of omgekeerde veredeling slaat op het omgekeerd doorlopen van het proces voor het maken van een F1-hybride (zie eerder pagina 12-13). Waar in een klassiek veredelingsproces ouderlijnen gebruikt worden om tot een beter presterende hybride te komen, kunnen met reverse breeding de ouderlijnen terug ontwikkeld worden met behulp van de hybride (Figuur 8). Deze nieuw gemaakte ouderlijnen kunnen dan in andere combinaties nieuwe hybriden opleveren. De techniek maakt gebruik van GGO-technologie tijdens het veredelingsproces, maar in het DNA van het eindproduct is er geen extra DNA ingebouwd of aangepast.

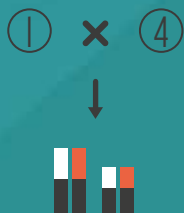
Reverse breeding maakt gebruik van een verstoring van de reductiedeling tijdens de vorming van de geslachtscellen. Chromosomen komen bij veel organismen voor in paren – de homologe chromosomen – waarvan een afkomstig van de moeder en een van de vader. Tijdens de reductiedeling wordt het aantal chromosomen gehalveerd. De halvering is nodig zodat na samensmelting van eicel en zaadcel terug het oorspronkelijk aantal chromosomen bekomen wordt. Net voor dat de homologe chromosomen uit elkaar getrokken worden, gebeurt vaak een uitwisseling tussen de chromosomen. Deze uitwisseling (ook crossing-over genoemd) zorgt er mee voor dat de verschillende geslachtscellen van eenzelfde ouder een andere genetische samenstelling hebben, zodat nakomelingen van dezelfde ouders verschillend zijn. Een bron voor extra genetische variatie dus. Voor reverse breeding moet de uitwisseling van stukken van chromosomen vermeden worden. Een aantal genen blijken essentieel te zijn om die uitwisseling tot stand te laten komen. Met behulp van GGO-technologie wordt in de geselecteerde hybride eerst een van



Figuur 8. Illustratie van reverse breeding. Met behulp van GGO-technologie wordt in de F1-hybride een stukje DNA ingebouwd (gele bol) dat vermenigvuldiging tussen homologe chromosomen voorkomt. Tijdens de vorming van de geslachtscellen (bv. pollenkorrels) wordt het aantal chromosomen gehalveerd zodat er van ieder chromosoom slechts 1 exemplaar is. Het DNA in deze cellen wordt daarna verdubbeld zodat er van ieder chromosoom 2 identieke kopijen zijn. Uit deze cellen worden nieuwe planten gegenereerd. Onder deze planten



oorspronkelijke hybride
uit andere ouders



bevinden zich terug de oorspronkelijke ouders van de F1 hybride (aangeduid met nummers 2 en 3), of planten (1 en 4) die verschillen van de oorspronkelijke ouders maar waaruit wel dezelfde hybride kan gemaakt worden. Via deze methode is het ook mogelijk om nieuwe combinaties te maken (bv. tussen 1 en 2) waardoor het kruisingsproduct identiek is aan 1 van de oorspronkelijke ouders behalve voor 1 chromosoom. Belangrijk om op te merken is dat enkel de planten met gele bol GGO-planten zijn.

deze genen uitgeschakeld (door het inbouwen van een RNAi-construct). Deze GGO-plant zal hierdoor pollenkorrels produceren waarvan het aantal chromosomen gehalveerd is zonder crossing-over te hebben ondergaan. De pollenkorrels (waarvan slechts de helft het RNAi-construct zullen bezitten) worden geïsoleerd waarna het DNA van de pollenkorrels verdubbeld wordt. Uit deze pollenkorrels kan met behulp van *in vitro*-teelt een volledige plant opgegroeid worden. De helft van de planten zijn dus geen GGO-planten, want ze hebben het RNAi-construct niet in hun DNA ingebouwd gekregen. Deze niet-GGO-planten worden geselecteerd en kunnen vervolgens gebruikt worden om de oorspronkelijke elitelijn te construeren om nieuwe hybriden te maken. De techniek kan ook gebruikt worden om één chromosoom van een homolog chromosomenpaar te vervangen door een kopij van het andere chromosoom. Dit kan wenselijk zijn als op één chromosoom te veel ongunstige kenmerken aanwezig zijn.

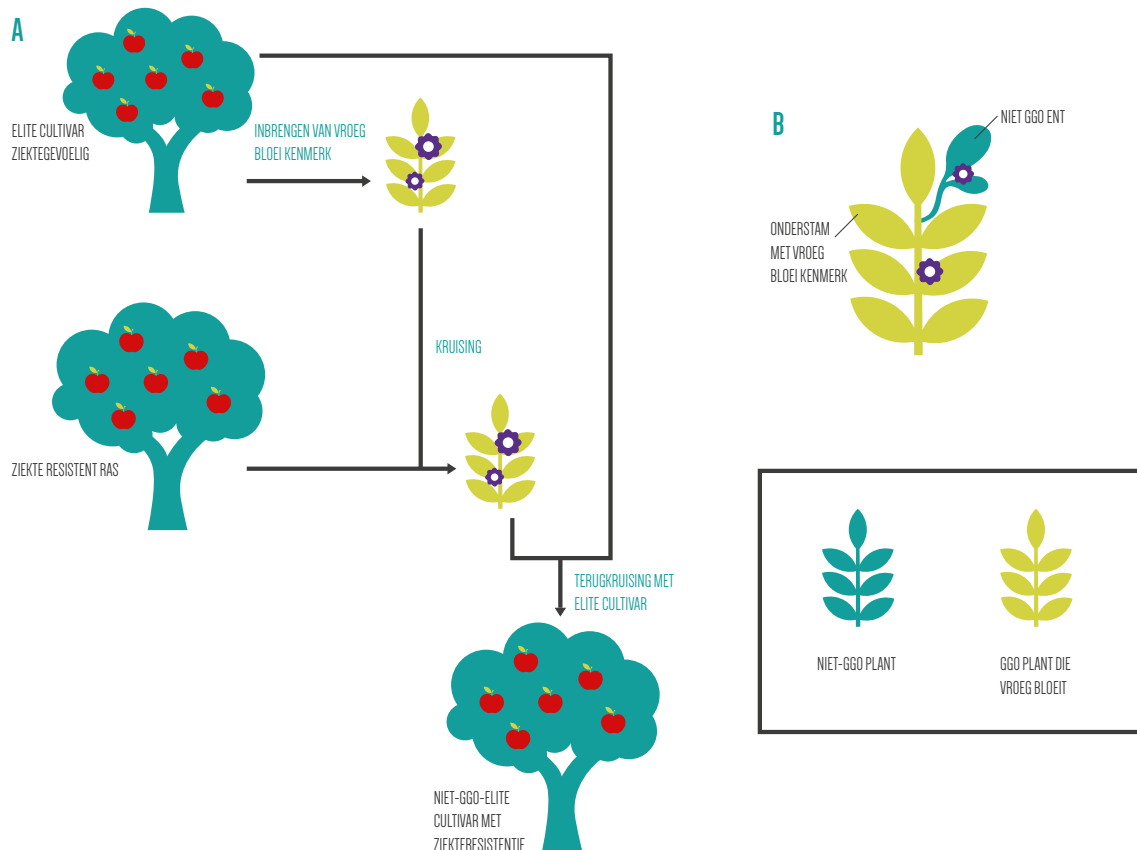
Versnelde veredeling voor bomen en struiken (Fast-track breeding)

Als veredeling van eenjarige landbouwgewassen een werk van lange adem is, dan is het veredelen van bomen een echt huzarenstukje. Voor vruchtdragende bomen (noten, pruimen, avocado, etc) bedragen de veredelingscycli gemakkelijk 10 jaar.²⁴ Een veredelaar moet na het planten van een eerste kruisingsproduct tot 10 jaar wachten vooraleer het kruisingsproduct bloeit en hij dus een nieuwe kruising kan uitvoeren met die plant. Dit komt door de langdurige juveniele periode (periode na kieming wanneer een boom niet bloeit en geen vruchten draagt). De juveniele periode is een soort van beschermingsmechanisme. Het zorgt ervoor dat een boom pas vruchten kan dragen wanneer hij groot en sterk genoeg is om de

competitie met andere planten aan te gaan. Bloeien kost immers energie. Door te vroeg in bloei te komen en vruchten te dragen, kan de groei van de boom in gedrang komen. Vermits er voor het verkrijgen van een nieuw ras meerdere opeenvolgende kruisingen nodig zijn, duurt het veredelen van een nieuwe fruitboom gemakkelijk 30 jaar.²⁴

Om de juveniele periode in te korten en dus sneller kruisingen te kunnen aanvatten, worden zaailingen vaak behandeld met plantengroei-hormonen of worden de omgevingsomstandigheden (temperatuur, daglengte) aangepast. Deze trucjes kennen slechts wisselend succes. De juveniele

periode kan ook ingekort worden met DNA-technologie. De methode steunt op de ontdekking van bepaalde genen die bepalen wanneer een plant bloeit. Onder invloed van specifieke interne en externe signalen worden deze bloeigenen geactiveerd waarna de plant zich voorbereidt om te bloeien en vruchten te dragen. Deze bloeigenen kunnen via genetische modificatie tot overexpressie gebracht worden in een boom, waardoor de zaailingen geen 5 tot 10 jaar zullen wachten om voor het eerst te bloeien maar dat onmiddellijk doen in het eerste jaar. De totale veredelingsperiode van een fruitboom kan op die manier ingekort worden van 30 jaar tot 5 jaar.²⁴



Figuur 9. A) Van een ziektegevoelige elite cultivar wordt een GGO-variant gemaakt die vroeg bloeit (licht groen). Dit GGO-boompje wordt gekruist met een niet-GGO ziekteresistent ras (donker groen). De GGO-nakomelingen (licht groen) kunnen onmiddellijk teruggekruist worden met de oorspronkelijke elite cultivar om zoveel mogelijk gunstige kenmerken terug samen te brengen en het vroegbloei-gen uit te kruisen. Het finale product is een niet-GGO boom met goede raskenmerken dat bovendien ziekteresistent is. B) In plaats van een GGO-variant te maken van de elite cultivar, kan een tak van de elite cultivar geënt worden op een GGO-boom met het vroegbloei kenmerk. De bloei inducerende eiwitten van de GGO-onderstam worden naar de ent getransporteerd waardoor de ent zal bloeien en kan gebruikt worden als stuifmeelleverancier voor volgende kruisingen.

In analogie met de vorig beschreven methode (reverse breeding), kunnen de extra toegevoegde bloeigenen in de laatste kruisingsstap terug verwijderd worden waardoor het finale product niet verschilt van een klassiek kruisingsproduct (Figuur 9A). Deze techniek wordt 'fast-track breeding' genoemd en wordt momenteel gebruikt in combinatie met merker-geassocieerde veredeling om ziekteresistentie in appel en pruim te introduceren.²⁴

Een variant van de 'fast-track' veredelingsmethode maakt gebruik van enten. De signalen van buitenaf of van binnenin de plant die aanleiding geven tot bloei worden gedetecteerd door het blad. In het blad worden de bloeigenen geactiveerd waarna specifieke eiwitten gevormd worden. Deze bloei-eiwitten worden getransporteerd naar de groeipunten van de plant om daar het bloei-proces in gang te zetten. Ook in geënte planten worden deze bloei-eiwitten getransporteerd van onderstam naar bovenstam.²⁴ Om het achteraf uitkruisen van toegevoegd DNA te vermijden, kan een scheut van een jonge zaailing geënt worden op een GGO-boom die de bloeigenen tot over-expressie brengt. De bloei-eiwitten zullen van de GGO-onderstam getransporteerd worden naar de ent waar ze bloei zullen initiëren (Figuur 9B). De bloeiende ent kan op deze manier binnen het jaar gebruikt worden als vaderplant (leverancier van stuifmeel) voor een volgende kruising. Een nadeel aan deze methode is dat het transport van de bloei-eiwitten van onderstam naar ent niet met 100% efficiëntie verloopt.²⁵

Agro-infiltratie

Agro-infiltratie maakt gebruik van *Agrobacterium tumefaciens*, de bodembacterie die DNA overbrengt naar plantencellen tijdens de ontwikkeling

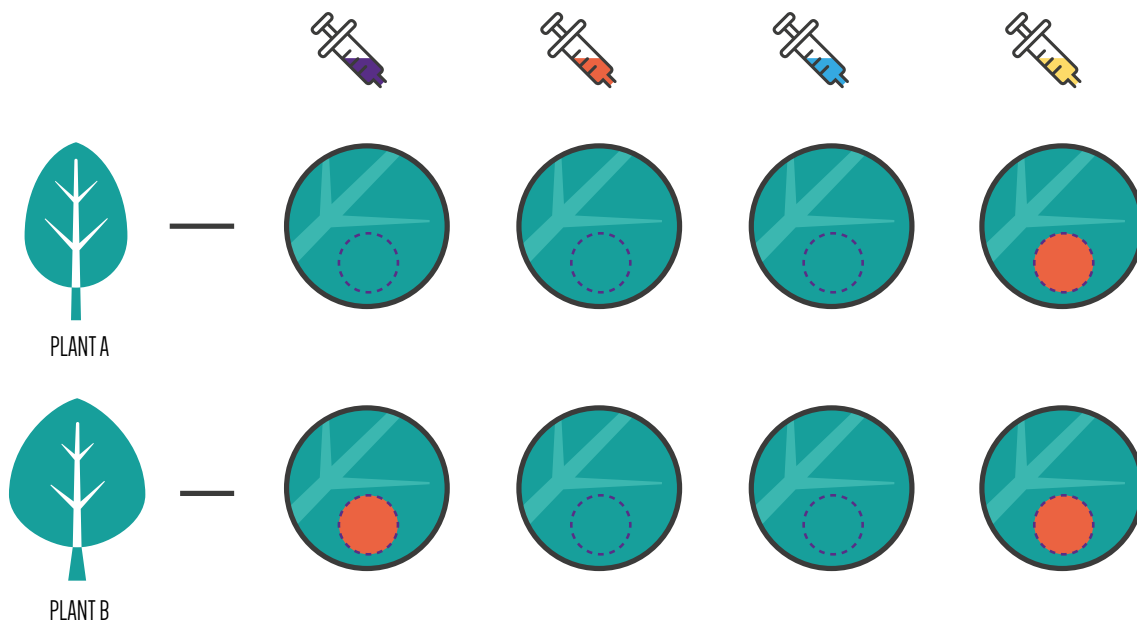
van een genetisch gewijzigde plant. *Agrobacterium* kan echter ook ingezet worden om kortstondig bepaalde eiwitten te laten produceren. *Agrobacterium*-infiltratie of afgekort agro-infiltratie is een techniek waarbij *Agrobacterium* in plantenweefsel gespoten wordt (meestal in een of meerdere bladeren) zodat de bacteriën zich tussen de plantencellen kunnen verspreiden. Vervolgens brengt *Agrobacterium* het gen van interesse in een of meerdere plantencellen waar het kortstondig tot expressie komt en leidt tot de productie van het overeenkomstige eiwit. Het gen kan ingebouwd worden in het DNA van enkele plantencellen maar dat hoeft niet te gebeuren om tot de productie van het eiwit te leiden.

Agro-infiltratie kan gebruikt worden voor de productie van complexe moleculen zoals antilichamen (zie kaderstuk) maar wordt voornamelijk ingezet als selectiemethode tijdens een veredelingsprogramma voor ziekte-resistente planten. Planten maken gebruik van een waaier aan afweermechanismen tegen bacteriën en schimmels maar hiervoor moet de plant de ziekteverwekkers eerst kunnen herkennen. Zo'n herkenning-mechanisme is gebaseerd op een sleutel-slot principe: een plant is resistent wanneer eiwitten van de ziekteverwekker (effectoren genoemd) worden herkend door resistentie-eiwitten van de plant. Indien dit niet het geval is, wordt de plant ziek. Om na te gaan of de resistentie-eiwitten in de plant in staat zijn om specifieke effectoren te herkennen, kunnen de effectoren geproduceerd worden in de plant via agro-infiltratie.²⁶ Hiervoor wordt de genetische informatie van de verschillende effectoren overgebracht naar afzonderlijke *Agrobacterium*-stammen. Voor iedere effector, een andere *Agrobacterium*-stam. De bladeren van de te testen planten worden vervolgens geïnfecteerd met de verschillen-

de *Agrobacterium*-stammen via agro-infiltratie (Figuur 10). Bij herkenning zal er een overgevoelighedsreactie te zien zijn op de plaats waar de *Agrobacterium*-stam is ingespoten. Deze reactie is met het blote oog waar te nemen als een zone van afgestorven plantencellen. Deze specifieke analysemethode laat toe om de functionaliteit en de spectrumbreedte van resistentiegenen na te gaan op een relatief eenvoudige manier.

Op regelgevingstechnisch vlak stelt zich echter de vraag wat er vervolgens moet gebeuren met de geteste plant. Moet die plant als GGO beschouwd

worden als slechts een beperkt aantal somatische cellen in een bepaald weefsel DNA ontvangen hebben van *Agrobacterium*? Moet een volledige plant als GGO bestempeld worden als slechts één blad een aantal GGO-cellen bevat? En wordt die plant dan terug niet-GGO als het blad afgeknipt wordt? Vallen de zaden en nakomelingen van een moederplant onder de GGO-regelgeving als een van de bladeren van die moederplant geïnfecteerd werd met *Agrobacterium*? De zaden en nakomelingen bevatten in ieder geval geen enkele wijziging in hun erfelijk materiaal.



Figuur 10. Illustratie van Agro-infiltratie. Verschillende *Agrobacterium* stammen (paars, oranje, blauw, geel) die telkens de genetische informatie voor de productie van andere effectoren bevatten, worden in een blad gebracht. Lokaal brengt *Agrobacterium* deze genetische informatie over naar bepaalde plantencellen. Als de door de plant geproduceerde effectoren de aanwezige resistentie-eiwitten herkennen, is er een overgevoelighedsreactie te zien (rode cirkel).

PRODUCTIE VAN GENEESMIDDELEN IN PLANTEN VIA AGRO-INFILTRATIE

De mens gebruikt planten voornamelijk voor de productie van voedsel en textiel, maar ook voor het vervaardigen van geneesmiddelen kunnen planten ingezet worden. Zo werd ZMapp, een van de meest beloftevolle behandelingen tegen Ebola tot dus ver, ontwikkeld met behulp van plantenbiotechnologie.²⁷ ZMapp is geen vaccin maar

bestaat uit een mengsel van drie verschillende antilichamen. Antilichamen zijn de 'vechtmachines' van ons lichaam en neutraliseren specifieke ziekteverwekkers waartegen ze ontwikkeld zijn. Dit in tegenstelling tot een vaccin dat afhankelijk is van het immuunsysteem van de patiënt.

De ZMapp-antilichamen werden oorspronkelijk verkregen uit muizen die in contact gebracht werden met een bepaald eiwit van het Ebola virus. In reactie hierop produceerden de muizen antilichamen. Deze antilichamen werden opgezuiverd en aangepast zodat ze beter zouden lijken op menselijke antilichamen. De genetische informatie voor de productie van deze aangepaste antilichamen werd ingebracht in tabaksplanten (met behulp van agro-infiltratie) die dan de gewenste antilichamen produceerden. De experimentele behandeling werd getest bij apen. Van de 21 dieren die geïnfecteerd werden met Ebola, kregen 18 de door planten geproduceerde antilichamen. Alle 18 dieren, genazen terwijl de 3 niet-behandelde dieren in de controlegroep stierven.²⁷ Ondertussen werden ook enkele mensen met het geneesmiddel behandeld.²⁸ Voor alle duidelijkheid, deze planten zijn niet bestemd voor consumptie en worden enkel ingezet als 'fabriekjes' voor de productie van geneesmiddelen. Rond deze toepassing van agro-infiltratie zijn er minder vragen gezien de plant enkel gebruikt wordt als productiemiddel en het product opgezuiverd wordt voor gebruik. In het finale product is dus geen DNA of plantenmateriaal meer aanwezig. Dit is zeer sterk te vergelijken met de productie van insuline door middel van GGO-bacteriën. Het finale geneesmiddel is DNA- en bacterievrij.

Mutatieveredeling 2.0

RNA-afhankelijke DNA-methylatie

RNA-afhankelijke DNA-methylatie is een vorm van 'gene silencing', het stilleggen van de functie van een gen.²⁹ De techniek veroorzaakt geen mutaties op DNA-niveau en de finale planten die op deze manier ontwikkeld zijn hebben geen DNA ingebouwd gekregen. Toch behandelen we deze techniek hier omdat er overerfbare veranderingen geïnduceerd worden, meer bepaald op het niveau van de epigenetica.³⁰ Epi betekent 'bijkomend bij' of 'supplementair aan' de genetische informatie die in het DNA gecodeerd zit. Epigenetica is dus het vakgebied binnen de

genetica dat erfelijke veranderingen bestudeert die hun oorsprong niet vinden in de volgorde van de DNA-letters.

De genetische informatie van hogere organismen zoals planten en dieren ligt vervat in het DNA. Deze informatie komt pas tot uiting wanneer de DNA-code eerst overgeschreven wordt naar boodschapper-RNA (transcriptie) waarna de RNA-code vertaald wordt naar de productie van een eiwit (translatie). Om te verhinderen dat een bepaald eiwit geproduceerd wordt en dus om de activiteit van het overeenkomstig gen stil te leggen (gene silencing), kan het bovenstaande mechanisme op twee manieren verstoord

worden: ofwel stimuleert men de afbraak van de tussenliggende RNA-moleculen zodat er geen eiwit kan gevormd worden, ofwel zorgt men dat de DNA-code niet overgeschreven kan worden naar boodschapper-RNA.³¹ De eerste manier (ook wel post-transcriptionele gene silencing genoemd) is een veel gebruikte techniek om een planteneigenschap uit te schakelen, maar ook om resistentie tegen virussen te ontwikkelen (zie achtergrondossier 'Een virus-resistente papaja voor Hawaï'²⁰). De tweede manier wordt transcriptionele gene silencing genoemd. RNA-afhankelijke DNA-methylatie is hier een voorbeeld van.³¹

Om de functie van een gen te beïnvloeden zonder het DNA zelf te wijzigen kan de promotor van dat gen gemethyleerd worden. Een promotor van een gen kan vergeleken worden met een schakelaar die bepaalt wanneer een gen aan- of uitstaat. DNA-methylatie betekent het binden van DNA met methyl groepen. Door de aanwezigheid van methylgroepen op het DNA van de promotor kan de expressie van het achterliggend gen volledig uitgeschakeld worden doordat er geen boodschapper-RNA meer gevormd wordt. Bij planten kunnen dergelijke methylaties erfelijk zijn.³² De kenmerken die door de DNA-methylatie geïnduceerd worden, worden dan overgedragen van ouders naar nakomelingen. De commerciële toepasbaarheid van de techniek wordt een beetje ondergraven door het feit dat de methylatie – en dus de interessante eigenschap(pen) – over meerdere generaties heen kan verzwakken of zelfs kan verdwijnen.³⁰

De kracht van de RNA-afhankelijke DNA-methylatietechniek is dat methylgroepen niet op willekeurige plaatsen aangebracht worden. Hierdoor kan op voorhand bepaald worden van welk(e) gen(en) de expressie zal beïnvloed

worden, dit in tegenstelling tot klassieke veredelings technieken. Om de techniek specifiek te maken, maakt men gebruik van RNA-moleculen; niet de boodschapper-RNA-moleculen waarvan eerder sprake (zie vorige paragraaf) maar andere (niet-coderende) RNA-moleculen. Hier komt dan ook de naam van: RNA-afhankelijke DNA-methylatie. Om de expressie van een specifiek gen uit te schakelen, brengt men in de plantencel of -weefsel zo'n RNA-molecule die kan binden met een specifiek stukje DNA in de gewenste promotor.³² De RNA-molecule leidt de methylatie-machinerie (van nature aanwezig in de plantencel) naar de specifieke promotor waarna deze gemethyleerd wordt.³⁰ De RNA-moleculen die de specificiteit bepalen van deze techniek kunnen met behulp van verschillende technieken in de plant gebracht worden, bijvoorbeeld via plantenvirussen of via de GGO-technologie.^{32,33} Indien er gekozen wordt voor de GGO-technologie wordt DNA ingebouwd (zorgt voor de productie van de niet-coderende RNA-molecule) en valt de plant onder de GGO-regelgeving. Echter, aangezien methylaties erfelijk zijn en het ingebouwde DNA-fragment via kruising terug verwijderd kan worden uit een plant, kan men een plant verkrijgen waarvan de promotor nog steeds gemethyleerd is maar die het extra DNA niet meer ingebouwd heeft. In dit geval wordt de GGO-technologie gebruikt om een eigenschap van een plant aan te passen maar de uiteindelijke plant die in de landbouw gebruikt kan worden bevat geen enkele wijziging aan de volgorde van de DNA-bouwstenen.

Oligonucleotide-directed mutagenese

Deze veredelingsmethode alsook de hierna besproken technieken zijn verbeterde versies van de

eerder beschreven mutatieveredeling (zie pagina 16-17). Waar de vroegere mutatieveredeling willekeurige veranderingen veroorzaakt in het DNA zonder te kunnen voorspellen wat hiervan het effect is, gaan de nieuwe mutatietechnieken een beperkt aantal DNA-veranderingen teweegbrengen op vooraf bepaalde plaatsen met een specifiek effect voor ogen (Figuur 11).

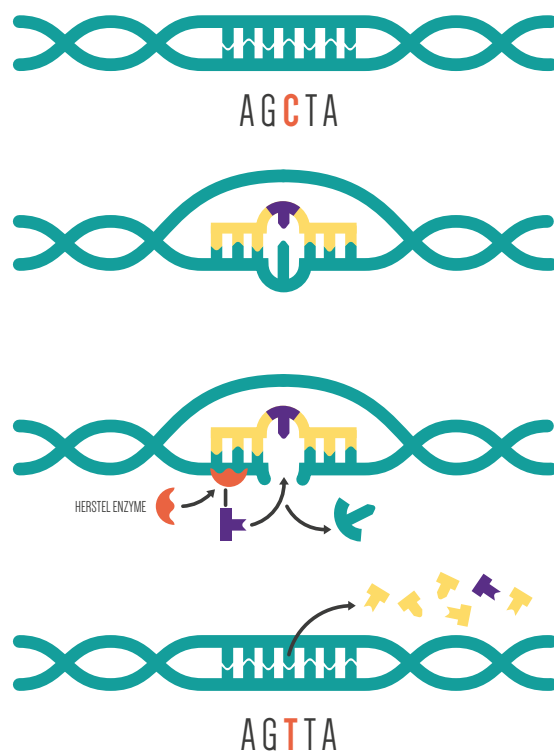
Voor oligonucleotide-directed mutagenese wordt eerst bepaald in welk stukje DNA van de plant een verandering moet veroorzaakt worden. Men maakt vervolgens een stukje enkelstrengig DNA (of een combinatie van DNA en RNA) van 20 tot 100 bouwstenen lang waar de gewenste verandering in aanwezig is en dat kan binden met het DNA-fragment dat aangepast moet worden in de plant.³⁴ Die gewenste verandering kan een deletie zijn (één of enkele DNA-bouwstenen worden verwijderd

uit het oorspronkelijk planten-DNA), een wijziging van een DNA-bouwsteen of een toevoeging van één of enkele bouwstenen. Het stukje DNA dat ontworpen wordt en de gewenste verandering bevat, wordt een oligonucleotide genoemd. Vervolgens wordt de oligonucleotide in een plantencel gebracht (vaak op mechanische wijze, zie eerder) waar het zal binden met het planten-DNA dat moet veranderd worden. Op de plaats van de mutatie is er geen overeenkomst met het

planten-DNA en is er bijgevolg geen binding. Het natuurlijk DNA-herstellingsmechanisme van de plant herkent deze fout. De cel herstelt het DNA door de mutatie van de oligonucleotide over te nemen in het planten-DNA.³⁴ De mutatie wordt op deze manier stabiel ingebouwd in het planten-DNA waarna de oligonucleotide spontaan afgebroken wordt. De plantencellen worden

vervolgens via weefselteelt opgegroeid tot planten die met behulp van kruisingen de aangebrachte mutatie kunnen overbrengen naar eliterassen.

De oligonucleotide-directed mutagenesetechniek wordt al meer dan 10 jaar succesvol toegepast zowel voor experimentele doeleinden als voor de veredeling van verschillende gewassen. Zo werden verschillende gewassen tolerant gemaakt tegen herbiciden en werd onder andere



Figuur 11. Een oligonucleotide met de gewenste sequentie bindt aan het te wijzigen stukje DNA. Een herstelenzym merkt het verschil op en past de DNA-sequentie aan.

rijst ontwikkeld met een hogere voedingswaarde (meer tryptofaan).³⁵⁻³⁹ Koolzaadrassen tolerant voor het herbicide sulfonylureum zijn vandaag commercieel beschikbaar in de Verenigde Staten.⁴⁰

Door de gecontroleerde en precieze manier van oligonucleotide-directed mutagenese worden willekeurige en overvloedige mutaties vermeden. De techniek bouwt geen extra genen in: de oligonucleotide fungeert enkel als een voorbeeld

hoe de plant zijn eigen DNA moet veranderen. Het finale product kan hierdoor niet onderscheiden worden van een plant die via kruisingen of mutatieveredeling is verkregen. Oligonucleotide-directed mutagenese is met andere woorden een verbeterde versie van de algemeen aanvaarde mutatieveredeling met veel minder risico's op ongewenste mutaties. Wetenschappelijk gezien is er dan ook geen enkel argument om planten die via Oligonucleotide-directed mutagenese veredeld zijn op een andere manier te behandelen dan planten verkregen via de klassieke mutatieveredeling.

CRISPR/Cas

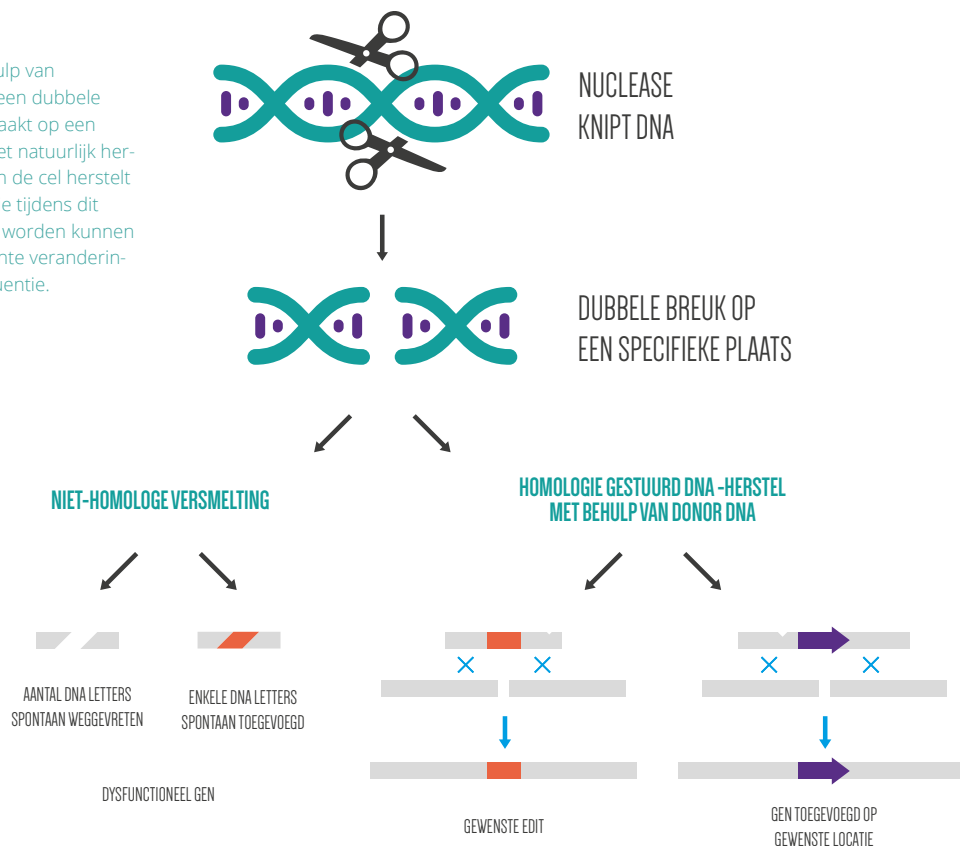
CRISPR/Cas (uitgesproken als krisper/kas) is net zoals oligonucleotide-directed mutagenese een methode om een mutatie te genereren op een vooraf bepaalde plaats in het planten-DNA.

CRISPR/Cas is een vorm van site-directed nuclease (SDN)-technologie, wat vertaald kan worden naar 'plaats-specifieke nuclease'. Voor dat wordt ingegaan op de CRISPR/Cas methode, worden eerst de principes van SDN toegelicht.

Nucleasen zijn enzymen die een breuk maken in DNA. Ze zijn te vergelijken met een schaar – op moleculaire grootte weliswaar – die DNA knipt. Specifieke nucleasen knippen DNA niet zo maar. Ze doen het enkel wanneer ze specifieke plaatsen in het DNA herkennen. Zo'n herkenningsplaats wordt bepaald door een opeenvolging van vier of meer DNA-bouwstenen, afhankelijk van het nuclease.

Er bestaat een grote verscheidenheid aan nucleasen die allemaal andere DNA-sequenties herkennen. Wanneer DNA doormidden geknipt wordt, zal het natuurlijk herstelmecanisme van een plant de breuk proberen herstellen. Er kunnen

Figuur 12. Met behulp van nucleasen worden een dubbele DNA-breuk veroorzaakt op een specifieke plaats. Het natuurlijk herstelmechanisme van de cel herstelt de breuk. Foutjes die tijdens dit proces veroorzaakt worden kunnen leiden tot interessante veranderingen in de DNA-sequentie.



zich twee scenario's voordoen. In het eerste geval worden de eindjes terug aan elkaar gezet via een proces dat in wetenschappelijk jargon niet-homologe samenvoeging van de uiteinden wordt genoemd (*non-homologous end joining*).⁴¹ Tijdens dit proces worden echter vaak fouten gemaakt waardoor een of meerdere DNA-bouwstenen verdwijnen of toegevoegd worden en er met andere woorden een of meerdere mutaties veroorzaakt worden (Figuur 12). In het ander geval kan de breuk hersteld worden met een stuk DNA dat aan de uiteinden een grote sequentie-overeenkomst (homologie) met de breuk vertoont. Dit wordt homologie-gestuurd DNA-herstel genoemd.⁴¹ Via deze methode kan dus een nieuw DNA-fragment ingebouwd worden of kan een fragment ingevoegd worden zodat de oorspronkelijke sequentie hersteld wordt maar met een of meerdere doelbewuste fouten. Met beide herstellingsmechanismen wordt de originele DNA-code op een specifieke plaats veranderd en op dit principe is CRISPR/Cas alsook de andere SDN-technologieën (zie kaderstuk 'Nuclease-technologie in vier smaken') gebaseerd.

De meeste nucleasen knippen DNA op basis van een korte herkenningsequentie. Wanneer deze nucleasen zonder meer losgelaten worden op het planten-DNA zal het DNA op te veel plaatsen geknipt worden. Immers, hoe kleiner een sequentie, hoe groter de kans dat die sequentie door toeval aanwezig is in het DNA. Om een nuclease zijn knipfunctie enkel op een specifieke plaats te laten uitoefenen moet het ofwel een voldoende lange herkenningsequentie hebben ofwel gekoppeld worden aan een andere molecule die zorgt voor de specificiteit. Bij CRISPR/Cas wordt de specificiteit van de schaar (nuclease) verkregen door het te koppelen aan een RNA-molecule. Bij de andere varianten van de SDN-technologie (zie Kaderstuk 'Nuclease-technologie in vier smaken') wordt de

specifieke schaar op een andere manier gevormd.

In CRISPR/Cas staat CRISPR staat voor Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats en Cas voor CRISPR-associated.⁴² De technologie is ontwikkeld met het CRISPR/Cas-verdedigingssysteem van bacteriën tegen virussen als basis.⁴³ Bij een virale infectie van bacteriën kunnen de RNA-moleculen van het CRISPR/Cas-systeem van de bacterie binden met het RNA van het virus. Door die binding worden nucleasen van de bacterie opgetrommeld waarna ze het viraal RNA knippen en dus het virus vernietigen. In het CRISPR/Cas-systeem zijn het dus de bacteriële RNA-moleculen die de specificiteit van de Cas-nucleasen bepalen.



Figuur 13. Met de CRISPR/Cas-methode wordt de specificiteit van het nuclease bepaald door een RNA-molecule (paars).

Na de opheldering van het CRISPR/Cas-verdedigingssysteem waren wetenschappers in staat om de werking te vereenvoudigen en de gidsende taak van de RNA-moleculen samen te brengen in slechts een RNA-molecule (Figuur 13).⁴³ Deze ontwikkeling geeft vandaag de mogelijkheid om met een eenvoudige en flexibele fusie van RNA en een nuclease, DNA-mutaties te veroorzaken in specifieke genen, niet alleen in bacteriën maar ook in planten en dieren.⁴⁴⁻⁴⁶ Bij de andere SDN-technologieën (zie Kaderstuk 'Nuclease-technologie in vier smaken') is het ontwikkelen van een nuclease een werk van lange adem. Hierdoor heeft de CRISPR/Cas-technologie een veel

grotere vlucht genomen dan de andere SDN-varianten en CRISPR/Cas is nu al de meest populaire SDN-technologie, zowel voor wetenschappelijk onderzoek als voor commerciële toepassingen. Het CRISPR/Cas-systeem is succesvol toegepast in de modelplanten Arabidopsis en tabak maar ook bij gewassen zoals tarwe, maïs, rijst en tomaat.⁴⁷

Voor CRISPR/Cas (alsook voor de andere SDN-technologieën) geldt dat vooraleer er mutaties kunnen gegenereerd worden, de noodzakelijke componenten (voor CRISPR/Cas is dat de nuclease gekoppeld aan de leidende RNA-molecule) moeten binnengebracht worden in de plantencel. Dit kan op verschillende manieren gebeuren. Een mogelijkheid is via de GGO-technologie. De genetische informatie voor de productie van de specifieke nuclease wordt dan stabiel ingebouwd, met andere woorden: in het planten-DNA zodat het van generatie naar generatie overgedragen wordt. De GGO-plant die op deze manier gecreëerd wordt, zal de CRISPR/Cas-moleculen aanmaken waarna ze hun functie kunnen uitvoeren. Na het creëren van de mutatie(s) zijn die moleculen en het overeenkomstig DNA van geen nut meer. De GGO-plant zal ingezet worden in een kruisingsprogramma waarbij nakomelingen geselecteerd worden die wel de mutatie overgeërfd hebben maar de CRISPR/Cas-genen niet meer bezitten.⁴⁸

Alternatief kan het nuclease en de bijhorende RNA-molecule onder vorm van RNA in een plantencel gebracht worden met behulp van plantenvirussen of rechtstreeks als eiwit-RNA complex.^{49,50} In beide gevallen wordt er geen erfelijk materiaal ingebouwd in het planten-DNA. In dit geval wordt nergens in het proces een GGO-plant gemaakt of gebruikt. Na het uitvoeren van hun muterende taak worden nuclease en RNA spontaan afgebroken door de plantencel.

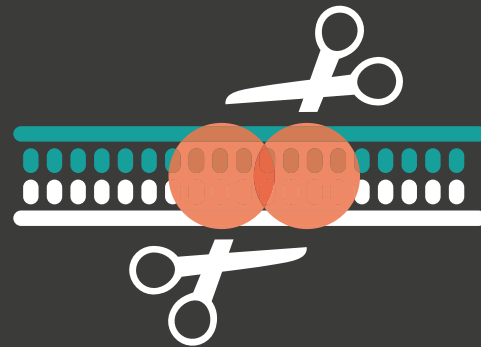
In beide gevallen (gebruik van een GGO-tussenproduct of niet) is het finale resultaat een plant met een of meerdere mutaties in een specifiek gen die niet

NUCLEASE-TECHNOLOGIE IN VIER SMAKEN

Naast de hierboven beschreven CRISPR/Cas-technologie zijn er nog drie bijkomende varianten op de site-directed nuclease-technologie (SDN-technologie). Ze verschillen in de manier waarop het DNA-knippende nuclease naar een specifieke DNA-sequentie geleid wordt.

Meganuclease-technologie

Meganucleasen zijn afkomstig uit micro-organismen zoals bacteriën en gisten en herkennen relatief grote DNA-sequenties (18 tot 30 bouwstenen) in vergelijking met standaard nucleasen.⁵¹ Slechts heel specifieke fragmenten die maar zelden voorkomen in het planten-DNA worden door meganucleasen geknipt. De specificiteit zit dus integraal in de meganuclease zelf waardoor het niet nodig is om ze te fuseren met een RNA-molecule (zoals bij CRISPR/Cas) of een DNA-herkendend eiwit zoals een zinkvinger (zie verder).



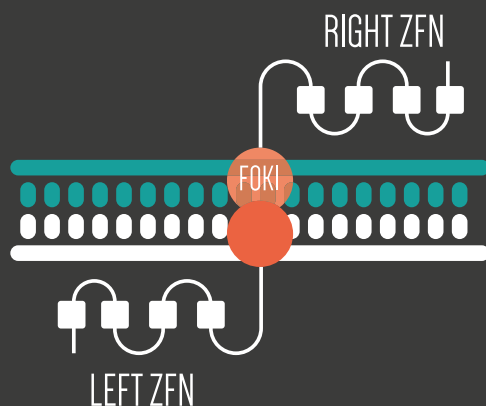
Meganucleasen (oranje bollen) herkennen slechts heel specifieke fragmenten die niet vaak voorkomen in het DNA. De specificiteit zit dus integraal in de herkenningsssequentie van de meganucleasen..

Een nadeel van deze techniek is dat het aantal in de natuur aanwezige meganucleasen beperkt is. Het is dus best mogelijk dat als men

een specifieke DNA-sequentie wil knippen er geen meganuclease voorhanden is die deze opdracht kan uitvoeren. Daarom probeert men sinds enkele jaren de herkenningsequenties van bestaande meganucleasen te veranderen zodat ze veel flexibeler kunnen ingezet worden.⁵¹ In dit geval kiest men vaak voor dimeren; twee nucleasen die samengevoegd worden. Deze aanpassing is niet evident omdat het ook de activiteit van het nuclease negatief kan beïnvloeden waardoor de toepasbaarheid van de meganuclease-technologie beperkt wordt.

Zinkvingernuclease-technologie

Zinkvingernucleasen (ZFN) zijn eiwitten die bestaan uit een zinkvingergedeelte en een nucleasegedeelte. Door het nuclease te koppelen aan een zinkvinger (eiwit dat met grote specificiteit bindt op een welbepaald DNA-fragment) zal de nuclease zijn knipfunctie enkel op die plaats kunnen uitoefenen. De specifieke werkwijze van de ZFN-technologie wordt dus volledig bepaald door het zinkvingergedeelte. Zinkvingernucleasen werken twee per twee, elk aan een kant van de DNA-dubbelstreng, om de specificiteit te verhogen. Ook hier is het theoretisch mogelijk om de herkenningsequentie

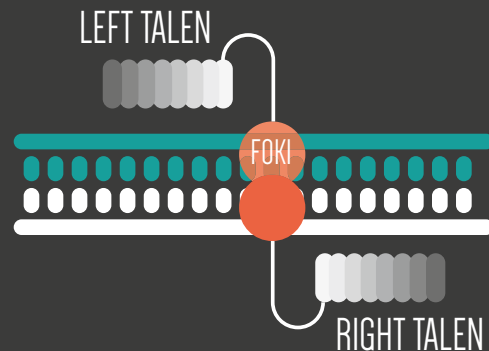


ZFNs bestaan uit een nuclease (FokI) en een DNA-bindend deel dat zorgt dat enkel een specifieke DNA-sequentie geknipt wordt.

van de zinkvinger zo aan te passen dat het ZFN om het even welke sequentie in het planten-DNA kan knippen. De praktijk leert echter dat het niet zo eenvoudig is om die aanpassingen succesvol en op een efficiënte manier uit te voeren.⁵² In tegenstelling tot CRISPR/Cas maakt zinkvingernuclease-technologie dus geen gebruik van RNA-moleculen maar van twee DNA-bindende eiwitten.

TALEN-technologie

TALEN staat voor Transcription Activator-Like Effector Nucleasen.⁵³ Net zoals bij zinkvingernucleasen zit ook in TALEN het woord nucleasen en is het de bedoeling om dubbelstrengige breuken in het DNA te induceren. De fusie tussen een nuclease en de TAL-effector is bedoeld om de nuclease niet overal te laten knippen maar slechts op één specifieke plaats in het planten-DNA. Ook TAL-effectoren werken twee per twee.



Gelijkelijk aan de ZFN-technologie bestaan TALENs uit een nuclease (FokI) en een DNA-bindend deel dat zorgt dat enkel een specifieke DNA-sequentie geknipt wordt.

Zo goed als alle veredelings technieken berusten op bestaande systemen in de natuur, ook de TALEN-technologie. TAL-effectoren zijn DNA-bindende eiwitten afkomstig van de bacterie *Xanthomonas*.⁵³ Deze bacterie veroorzaakt ziekten bij verschillende plantensoorten. Tijdens het infectieproces van de plant door *Xanthomonas*, injecteert de bacterie TAL-effectoren in de plantencellen. De TAL-effectoren

worden getransporteerd naar de celkern om daar te binden op het planten-DNA, meer bepaald op promotoren (aan- en uitschakelaar) van bepaalde genen. De activiteit van plantengenen die de infectie van de bacterie ten goede komen, wordt hierdoor geactiveerd. *Xanthomonas* gebruikt de TAL-effectoren dus om de gevoeligheid van de plant te vergroten. De DNA-herkenningssequentie van de TAL-effectoren kan aangepast worden zodat TAL-effectoren ontwikkeld kunnen worden die zo goed als alle DNA-sequenties kunnen herkennen. Door specifieke TAL-effectoren te koppelen aan een nuclease kunnen DNA-breuken veroorzaakt worden – en dus mutaties gegenereerd worden – in zo goed als alle genen. Net zoals bij de vorig beschreven plaats-specifieke nucleasetechnieken beperkt het aanpassen van de DNA-herkenningssequentie van de TAL-effectoren een vlot gebruik.

Een mooi voorbeeld van de kracht van de nucleasetechnologie is de ontwikkeling van tarwe die resistent is tegen meeldauw.⁴⁸ Het genoom van tarwe is groot en complex. Zo heeft broodtarwe (*Triticum aestivum*) van ieder gen zes kopijen. Om tarwe resistent te maken tegen meeldauw moeten de zes kopijen van een bepaald gen uitgeschakeld worden. Door gebruik te maken van straling of chemicaliën (klassieke mutatieveredeling, zie eerder) is dit rond-uit ondoenbaar omdat men niet gericht kan werken. Chinese onderzoekers probeerden het succesvol met de TALEN-technologie. De zes tarwe DNA-sequenties werden tegelijk op een specifieke plaats geknipt waardoor de functie van de genen verloren ging.⁴⁸ De SDN-technologieën kunnen dus een grote meerwaar-

de betekenen in het ontwikkelen van nieuwe rassen met nieuwe kenmerken.

Welke DNA aanpassingen kan je bekomen met CRISPR/Cas?

Afhankelijk van welke aanpassing er gebeurt in het DNA kent de SDN-technologie drie varianten⁵⁴:

SDN-1: de methode zal enkel op een vooraf bepaalde plaats in het DNA een breuk veroorzaken. Het natuurlijk herstellingsmechanisme van de plant zal de breuk herstellen. Vaak gebeurt dat niet perfect waardoor een of meerdere bouwstenen verdwijnen of erbij komen of verkeerde bouwstenen gebruikt worden. Door deze mutaties kan de functie van het gen verloren gaan.

SDN-2: het werkingsmechanisme is gelijkaardig aan SDN-1 maar nu wordt als het ware een handleiding meegegeven voor de plant (onder de vorm van een klein stukje DNA) hoe de DNA-breuk moet hersteld worden. Op voorhand wordt dus bepaald welke bouwstenen van het originele planten-DNA moeten veranderd of toegevoegd worden. Deze variant op de SDN-technologie zit echter nog in de onderzoeksfase.

SDN-3: het werkingsmechanisme is opnieuw gelijkaardig aan SDN-1 maar nu wordt een groot stuk DNA toegevoegd aan het planten-DNA. Het resultaat van deze SDN-variant verschilt dus sterk van SDN-1 en SDN-2, maar ook SDN-3 zit nog volledig in de onderzoeksfase. Deze techniek hoort bovendien niet thuis onder mutatieveredeling 2.0 en wordt later besproken (zie pagina 37).

meer te onderscheiden is van een plant die via klassieke mutatieveredeling is ontwikkeld. Wetenschappelijk gezien zijn er dan ook geen argumenten om deze planten op vlak van risicoanalyse anders te gaan evalueren dan planten verkregen via de klassieke mutatieveredeling.

Cis- en intragenese

Cisgenese

Alle genetisch gemodificeerde planten die vandaag commercieel geteeld worden, zijn transgene planten. 'Trans' wijst op 'afkomstig van een andere groep'. Met behulp van genetische modificatie is in transgene gewassen een DNA-fragment toegevoegd afkomstig van een soort waar het gewas in kwestie niet mee kan kruisen; een maïsgen ingebouwd in een rijstplant bijvoorbeeld. Maar ook een bacterieel Bt-gen inbouwen in katoen om insect-resistentie te verkrijgen (zie achtergrondossier 'Bt-katoen in India'²⁰) of een viraal mantelwitgen inbouwen in papaja om virus-resistentie te ontwikkelen (zie achtergrondossier 'Virus-resistente papaja in Hawaï'²⁰) leidt tot transgene planten.

Bij cisgenese wordt net zoals bij transgenese extra DNA stabiel ingebouwd in het planten-DNA. Het grote verschil tussen trans- en cisgenese is de oorsprong van het DNA. Bij cisgenese is het extra DNA afkomstig uit een plant waar de acceptorplant (plant die het extra DNA ingebouwd krijgt) wel mee kan kruisen. 'Cis' slaat op 'binnen dezelfde kruisbare groep'. Een tomatengen in tomaat brengen bijvoorbeeld. Cisgenese beoogt het resultaat dat men met traditionele kruisingen kan verkrijgen maar op een veel snellere en efficiëntere manier. Een mooie toepassing van cisgenese is het ontwikkelen van een aardappel die resistent is tegen de aardappelziekte. Wilde aardappelsoorten uit Mexico en de Andes bezit-

ten genen die hen resistent maken tegen deze bij ons alomtegenwoordige ziekte. De genen kunnen via kruisingen overgedragen worden naar onze consumptieaardappelen maar dit proces verloopt uiterst traag en moeizaam. Bovendien worden er bij kruisingen ook niet-gewenste eigenschappen overgeërfd. Met cisgenese kunnen de resistentiegenen in één stap ingebouwd worden in het DNA van onze Bintje- en Nicola-aardappelen zonder verlies van raseigenschappen. Dergelijke cisgene aardappelen worden momenteel ontwikkeld in België en Nederland.²⁰

Om aan de definitie van cisgenese te voldoen moeten de genen die ingebracht worden ook voorzien zijn van hun oorspronkelijke regulatoire eenheden (o.a. promotoren); schakelaars die beslissen wanneer de genen aangeschakeld of uitgeschakeld worden en in welke mate. De volledige erfelijke informatie voor een bepaalde eigenschap wordt dus integraal overgenomen en het gen heeft identiek dezelfde sequentie zoals in de kruisbare plant waar het vandaan komt. Cisgene planten mogen geen bacteriële selectiegenen bevatten (zoals antibioticumresistentiegenen) of selectiegenen afkomstig van niet-kruisbare soorten. Beide soorten selectiegenen kunnen wel gebruikt worden tijdens het proces van genetische modificatie maar moeten nadien verwijderd worden uit het planten-DNA zodat het finale product enkel genen bevat van een kruisbare plant.

Omdat natuurlijke kruisingsbarrières niet worden overschreden, wordt cisgenese (als vorm van genetische modificatie) beter aanvaard door het grote publiek.⁵⁵ Nochtans is er in het licht van milieu- en voedselveiligheid geen enkel verschil tussen cisgenese en transgenese. Het zijn immers de eigenschappen van de ingebrachte genen die bepalen of een gewas veilig is, niet of

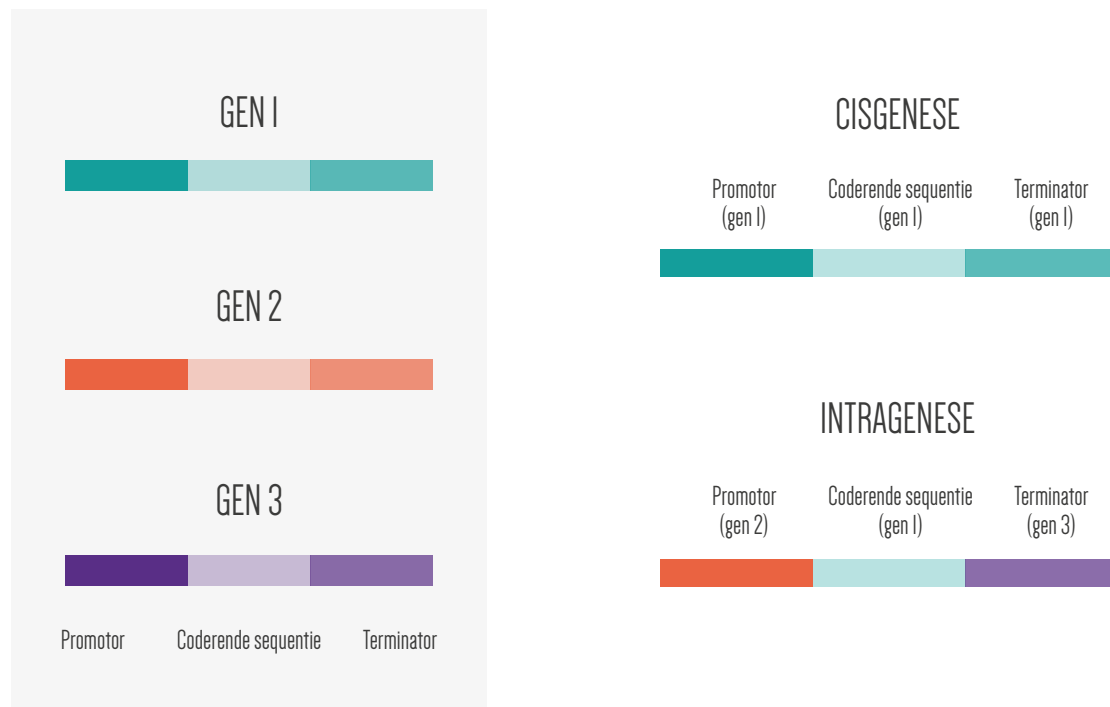
deze genen al dan niet afkomstig zijn van dezelfde soort of een kruisbare soort. Het verschil tussen cisgenese en transgenese kan evenwel belangrijk zijn op het wettelijk vlak. Afhankelijk van de wetgeving – en die verschilt wereldwijd – kunnen bepaalde toepassingen van cisgenese al dan niet gereguleerd worden.

Intragenese

Bij intragenese wordt ook een bepaald DNA-fragment stabiel ingebouwd in het planten-DNA en maakt men eveneens gebruik van DNA afkomstig van een kruisbare soort of van dezelfde soort. Het is dus net zoals cisgenese, een bepaald type van genetische modificatie. Het verschil met cisgenese is echter dat men de originele samenstelling van het DNA-fragment niet behoudt. Bij intragenese worden nieuwe combinaties gemaakt van het bestaande DNA (Figuur 14).⁵⁶ Het meest voorkomende geval is dat gen X gecombineerd

wordt met de genschakelaar (of promotor) van gen Y. Ook dit is natuurgetrouw gezien vele organismen (waaronder planten) tijdens de evolutie spontane DNA-herschikkingen ondergingen waardoor nieuwe DNA-combinaties gevormd zijn. Dit gebeurde willekeurig en de individuen die ongunstige herschikkingen ondergingen verdwenen. Met intragenese wordt deze toevalsfactor uitgesloten.

Intragenese is een interessante veredelingsmethode om een bepaalde eigenschap die al van nature aanwezig is in de plant (bv. productie van een bepaalde vitamine in de bladeren) ook in het oogstbare deel (bv. de zaden) tot uiting te laten komen. Omgekeerd kan ook. Een ongewenste eigenschap in het oogstbare deel kan verwijderd of verminderd worden door het gen in het specifieke plantenorgaan via een andere genschakelaar in een slapende toestand te houden. Door bepaalde genen andere schakelaars te geven, kan de expressie



Figuur 14. Bij cisgenese wordt de originele samenstelling van het DNA-fragment behouden, bij intragenese worden nieuwe combinaties gemaakt van het bestaande DNA.



van de bestaande erfelijke informatie geoptimaliseerd worden naar menselijke behoefte zonder dat soortvreemd DNA moet ingebouwd worden.^{56,57}

GGO 2.0

SDN-3

De site-directed nucleasetechnologie werd eerder besproken (zie pagina 30) en zoals vermeld, wordt onderscheid gemaakt tussen SDN-1, SDN-2 en SDN-3 (zie Kaderstuk “Welke DNA aanpassingen kan je bekomen met CRISPR/Cas?”). De versie SDN-3 behandelen we hier omdat deze methode toelaat relatief grote DNA-fragmenten stabiel in te bouwen in het planten-DNA, in tegenstelling tot de zeer beperkte DNA-aanpassingen door SDN-1 en SDN-2.

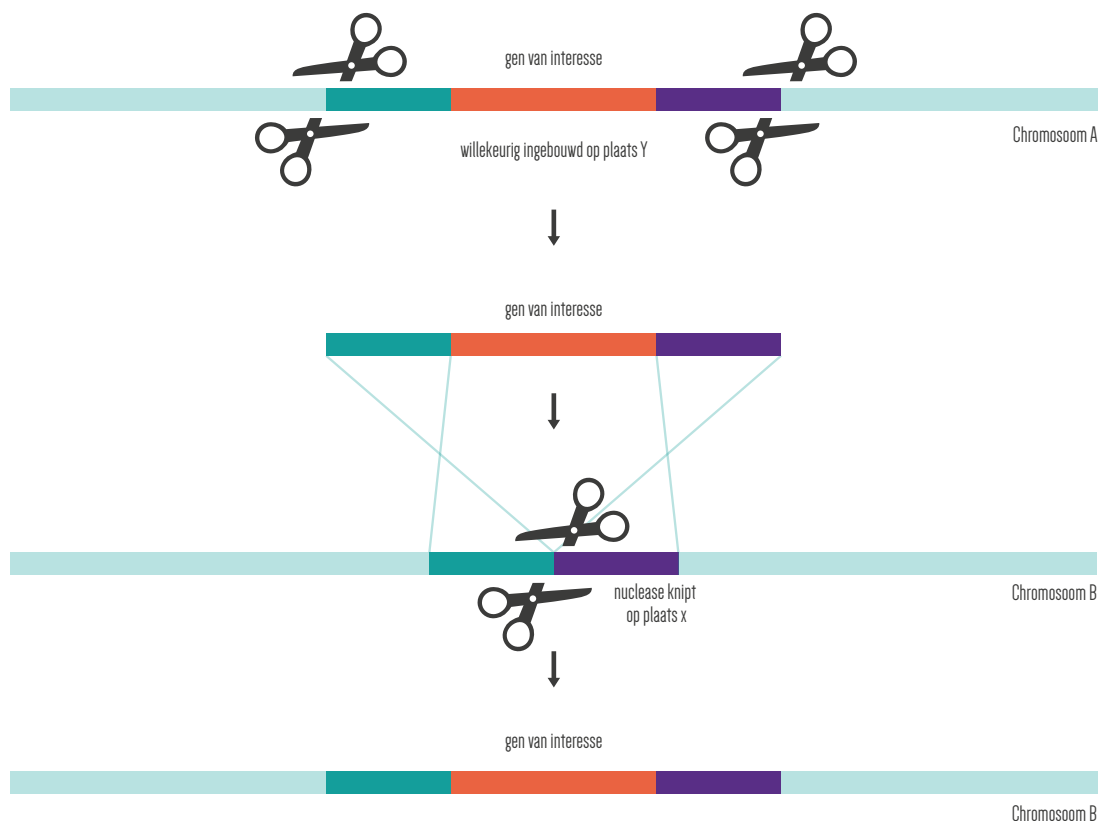
De SDN-3 methode specificeert niet welk soort DNA ingebouwd wordt. Dit kan zowel DNA van

een kruisbare plant zijn – waardoor men een cis- of intragene plant bekomt – maar het kan ook soortvreemd DNA zijn – waardoor een transgene plant gemaakt wordt. Wel moet gezorgd worden dat het DNA-fragment aan beide uiteinden een sequentie bevat met homologie aan de plaats in het planten-DNA waar het ingebouwd moet worden. Dit om homologie-gestuurd DNA-herstel te verkrijgen (zie pagina 31).

Het DNA dat toegevoegd moet worden, kan op verschillende manieren aangeleverd worden. In het eerste geval kan het DNA-fragment kortstondig in een plantencel gebracht worden (mechanisch via het ‘genenkanon’ of via *Agrobacterium*) waarna het stabiel in het DNA ingebouwd wordt op de plaats door de SDN aangeduid (plaats X, zie figuur 15). In het tweede geval kan het extra DNA eerst ingebouwd worden op een willekeurige plaats

(plaats Y, zie figuur 15). Wanneer de SDN in actie schiet zal het drie DNA-breuken veroorzaken in plaats van een: op plaats X (de gewenste plaats in het planten-DNA) en links en rechts van het toe te voegen DNA (plaats Y) waardoor het extra DNA als het ware uitgeknipt wordt. In een aantal gevallen zal het DNA-herstellingsmechanisme van de plant de drie breuken zo herstellen dat het uitgeknipt extra DNA op plaats X terecht komt in plaats van terug op plaats Y, (figuur 15). Net zoals bij SDN-1 en SDN-2 wordt tijdens het verdere veredelingsproces de plaatsspecifieke nuclelease (alsook het DNA-donorconstruct) weg geselecteerd waardoor het niet meer aanwezig is in het finale product. Ten opzichte van de klassieke GGO-technologie heeft SDN-3 technologie het grote voordeel dat men vooraf exact kan bepalen waar in het plan-

ten-DNA het extra DNA wordt toegevoegd. Bij de klassieke GGO-technologie kan dat niet gestuurd worden. Dit voordeel van de nieuwe technologie wordt des te interessanter als men een nieuwe eigenschap met een reeds bestaande eigenschap samen wil laten overerven. Door het gen dat zorgt voor de nieuwe eigenschap in te bouwen voor of na het gen van een bestaand kenmerk weet men zeker dat beide genen samen zullen overerven naar de nakomelingen. Echter, door de huidige lage efficiëntie van de SDN-3 techniek en de technische moeilijkheden blijft het uitvoeren van de SDN-3 techniek voorlopig beperkt tot het aantonen dat de methode werkt ('proof-of-concept').^{58,59}



Figuur 15. SDN-3 is een methode om op een specifieke plaats een extra stuk DNA in te bouwen. Het gen van interesse (ofwel als vrij DNA ingebracht ofwel eerst uitknipt op chromosoom A) heeft aan beide uiteinden stukjes DNA (blauw en paars) die homolog zijn aan de in te bouwen plaats. Chromosoom B wordt opengeknip met behulp van een SDN-technologie (ZFN, TALEN, CRISPR/Cas) waarna het gen van interesse ingebouwd wordt.

4 Besluit

Om ons voedselproductiesysteem efficiënter, duurzamer en flexibeler te maken moet blijvend ingezet worden op plantenveredeling en teelttechnieken. Het genetisch aanpassen van gewassen aan onze behoeften is van alle tijden. Nieuwe technieken om nog doelgerichter te werken, zullen blijven ontwikkeld worden en vormen de gereedschapskist van de veredelaar. Algemeen kan gesteld worden dat de technologie waarmee een plant een bepaald kenmerk gekregen heeft, ondergeschikt is aan de impact van het kenmerk zelf.

In dit dossier werd een overzicht gegeven van de verschillende methoden die ingezet kunnen worden om planten genetisch aan te passen aan onze behoeften. Dit gaat van de meest traditionele technieken zoals kruisen, over genetische modificatie tot de allernieuwste methoden waarvan vele nog geen commerciële toepassingen hebben. Een aantal van de nieuwe veredelingsmethoden heeft gemeenschappelijk dat tijdens het ontwikkelingsproces een of meerdere GGO-planten gebruikt worden. Echter het finale product onderscheidt zich van de GGO-ouderplanten doordat het geen extra toegevoegd DNA bevat. Bovendien zijn de wijzigingen in het DNA van het finale product niet meer te onderscheiden van spontaan ontstane genetische veranderingen. Dit laatste heeft tot gevolg dat bij eventuele regulatie de producten van bepaalde nieuwe veredelingstechnieken niet meer te onderscheiden zijn van de producten verkregen door traditionele veredelingsmethoden.

Alertheid voor nieuwe producten en nieuwe productietechnologieën moet aangemoedigd worden en vormt een hoeksteen in het garanderen van de milieu- en voedselveiligheid. Uit politiek en regelgevend oogpunt is het evenwel belangrijk dat innovatie voldoende kansen blijft krijgen en dat de discussie over nieuwe technologieën inhoudelijk gevoerd wordt op basis van wetenschappelijke feiten. Met dit achtergrondossier trachten we bij te dragen tot een bredere kennis en grotere appreciatie van plantenveredeling en dragen zo hopelijk bij tot een sereen debat en een proportioneel regulatorisch kader voor de nieuwe veredelingstechnieken.

5 Referenties

- 1 Kempin, S. A., Savidge, B. & Yanofsky, M. F. (1995). Molecular basis of the cauliflower phenotype in *Arabidopsis*. *Science* 267, 522-525.
- 2 FAOSTAT (2015). Available via <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>.
- 3 Doebley, J. (2004). The genetics of maize evolution. *Annu Rev Genet* 38, 37-59.
- 4 Evenson, R. E. & Gollin, D. (2003). Assessing the impact of the green revolution, 1960 to 2000. *Science* 300, 758-762.
- 5 Wheeler, T. & von Braun, J. (2013). Climate change impacts on global food security. *Science* 341, 508-513.
- 6 Finn, C. E., Retamales, J. B., Lobos, G. A. & Hancock, J. F. (2013). The Chilean Strawberry (*Fragaria chiloensis*): Over 1000 Years of Domestication. *Hortscience* 48, 418-421.
- 7 Parkin, I. A. et al. (2014). Transcriptome and methylome profiling reveals relics of genome dominance in the mesopolyploid *Brassica oleracea*. *Genome Biol* 15, R77.
- 8 Malek, M. A., Ismail, M. R., Rafii, M. Y. & Rahman, M. (2012). Synthetic *Brassica napus* L.: development and studies on morphological characters, yield attributes, and yield. *ScientificWorldJournal* 2012, 416901.
- 9 Hochholding, F. & Hoecker, N. (2007). Towards the molecular basis of heterosis. *Trends Plant Sci* 12, 427-432.
- 10 Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Mol Biotechnol* 37, 169-180.
- 11 Moose, S. P. & Mumm, R. H. (2008). Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant Physiol* 147, 969-977.
- 12 King, Z., Serrano, J., Roger Boerma, H. & Li, Z. (2014). Non-toxic and efficient DNA extractions for soybean leaf and seed chips for high-throughput and large-scale genotyping. *Biotechnol Lett* 36, 1875-1879.
- 13 Stadler, L. J. (1928). Genetic Effects of X-Rays in Maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* 14, 69-75.
- 14 Stadler, L. J. (1928). Mutations in Barley Induced by X-Rays and Radium. *Science* 68, 186-187.
- 15 Life Sciences Foundation Magazine (2012). Atomic gardens: public perceptions and public policy. Beschikbaar via <http://biotechhistory.org/wp-content/uploads/2014/11/LSFMagSpring2012.pdf> Lente 2012.
- 16 Hensz, R. A. (1972). Grapefruit tree. US Patent No. PP3,222. Washington, DC: US Patent and Trademark Office.
- 17 Ahloowalia, B. S., Maluszynski, M. & Nichterlein, K. (2004). Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica* 135, 187-204.
- 18 Joint FAO/IAEA Programme (Database of mutant variety and genetic stocks. Beschikbaar via <http://mvgs.iaea.org/>.
- 19 Grunewald, W. & Bury, J. (2014). De GGO-revolutie. Waarom biotechnologie in de landbouw een grote troef is voor mens en milieu. Uitgeverij Lannoo Campus, 178 pag.
- 20 VIB (2015). VIB achtergrond dossiers. Beschikbaar via www.vib.be/plantenbiotech.
- 21 Zaenen, I., Van Larebeke, N., Van Montagu, M. & Schell, J. (1974). Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *J Mol Biol* 86, 109-127.
- 22 Granett, J., Walker, M. A., Kocsis, L. & Omer, A. D. (2001). Biology and management of grape phylloxera. *Annu Rev Entomol* 46, 387-412.
- 23 Citovsky, V. & Zambryski, P. (2000). Systemic transport of RNA in plants. *Trends Plant Sci* 5, 52-54.
- 24 van Nocker, S. & Gardiner, S. E. (2014). Breeding better cultivars, faster: applications of new technologies for the rapid deployment of superior horticultural tree crops. *Horticulture Research* doi:10.1038/hortres.2014.22.
- 25 Wenzel, S., Flachowsky, H. & Hanke, M. V. (2013). The Fast-track breeding approach can be improved by heat-induced expression of the FLOWERING LOCUS T genes from poplar (*Populus trichocarpa*) in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 115, 127-137.
- 26 Vleeshouwers, V. G. et al. (2011). Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors. *Annu Rev Phytopathol* 49, 507-531.
- 27 Qiu, X. et al. (2014). Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature* 514, 47-53.
- 28 NBC News (2014). What cured Ebola patients Kent Brantly and Nancy Writebol? Beschikbaar via <http://www.nbcnews.com/storyline/ebola-virus-outbreak/what-cured-ebola-patients-kent-brantly-nancy-writebol-n186131>.

- 29 Zhang, H., He, X. & Zhu, J. K. (2013). RNA-directed DNA methylation in plants: Where to start? *RNA Biol* 10, 1593-1596.
- 30 Matzke, M. A., Kanno, T. & Matzke, A. J. (2015). RNA-Directed DNA Methylation: The Evolution of a Complex Epigenetic Pathway in Flowering Plants. *Annu Rev Plant Biol* 66, 243-267.
- 31 Matzke, M. A. & Moshier, R. A. (2014). RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat Rev Genet* 15, 394-408.
- 32 Jones, L., Ratcliff, F. & Baulcombe, D. C. (2001). RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Curr Biol* 11, 747-757.
- 33 Deng, S. et al. (2014). Transcriptional silencing of Arabidopsis endogenes by single-stranded RNAs targeting the promoter region. *Plant Cell Physiol* 55, 823-833.
- 34 Gocal, G. F. W., Schöpke, C. & Beetham, P. R. (2015). Oligo-mediated targeted gene editing. In: *Advances in New Technology for Targeted Modification of Plant Genomes*, DOI 10.1007/978-1-4939-2556-8_5, F. Zhang et al (eds.).
- 35 Beetham, P. R., Kipp, P. B., Sawycky, X. L., Arntzen, C. J. & May, G. D. (1999). A tool for functional plant genomics: chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause in vivo gene-specific mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8774-8778.
- 36 Zhu, T. et al. (1999). Targeted manipulation of maize genes in vivo using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8768-8773.
- 37 Okuzaki, A. & Toriyama, K. (2004). Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-directed gene targeting in rice. *Plant Cell Rep* 22, 509-512.
- 38 Dong, C., Beetham, P., Vincent, K. & Sharp, P. (2006). Oligonucleotide-directed gene repair in wheat using a transient plasmid gene repair assay system. *Plant Cell Rep* 25, 457-465.
- 39 Saika, H. et al. (2011). Application of gene targeting to designed mutation breeding of high-tryptophan rice. *Plant Physiol* 156, 1269-1277.
- 40 Cibus website: <http://www.cibus.com/products.php>.
- 41 Symington, L. S. & Gautier, J. (2011). Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet* 45, 247-271.
- 42 Chen, K. & Gao, C. (2015). Developing CRISPR technology in major crop plants. In: *Advances in New Technology for Targeted Modification of Plant Genomes*, DOI 10.1007/978-1-4939-2556-8_5, F. Zhang et al (eds.).
- 43 Jinek, M. et al. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816-821.
- 44 Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F. & Marraffini, L. A. (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol* 31, 233-239.
- 45 Cong, L. et al. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819-823.
- 46 Shan, Q. et al. (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 31, 686-688.
- 47 Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., Patron, N. J. & Nekrasov, V. (2015). Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Curr Opin Biotechnol* 32, 76-84.
- 48 Wang, Y. et al. (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol* 32, 947-951.
- 49 Vainstein, A., Marton, I., Zuker, A., Danziger, M. & Tzfira, T. (2011). Permanent genome modifications in plant cells by transient viral vectors. *Trends Biotechnol* 29, 363-369.
- 50 Woo, J. W. et al. (2015). DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol* 33, 1162-1164.
- 51 Daboussi, F., Stoddard, T. J. & Zhang, F. (2015). Engineering meganuclease for precise plant genome modification. In: *Advances in New Technology for Targeted Modification of Plant Genomes*, DOI 10.1007/978-1-4939-2556-8_5, F. Zhang et al (eds.).
- 52 Qi, Y. (2015). High efficient genome modification by designed zinc finger nuclease. In: *Advances in New Technology for Targeted Modification of Plant Genomes*, DOI 10.1007/978-1-4939-2556-8_5, F. Zhang et al (eds.).
- 53 Christian, M. & Voytas, D. F. (2015). Engineered TAL effector proteins: versatile reagents for manipulating plant genomes. In: *Advances in New Technology for Targeted Modification of Plant Genomes*, DOI 10.1007/978-1-4939-2556-8_5, F. Zhang et al (eds.).

- 54 Advisory Committee on Releases to the Environment (ACRE) (2013). New techniques used in plant breeding. Beschikbaar via https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/239542/new-techniques-used-in-plant-breeding.pdf.
- 55 Gaskell, G. et al. (2010). Europeans and biotechnology in 2010. Winds of change? A report to the European Commission's Directorate-General for Research.
- 56 Holme, I. B., Wendt, T. & Holm, P. B. (2013). Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotechnol J* 11, 395-407.
- 57 Rommens, C. M., Haring, M. A., Swords, K., Davies, H. V. & Belknap, W. R. (2007). The intragenic approach as a new extension to traditional plant breeding. *Trends Plant Sci* 12, 397-403.
- 58 Cai, C. Q. et al. (2009). Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases. *Plant Mol Biol* 69, 699-709.
- 59 Shukla, V. K. et al. (2009). Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature* 459, 437-441.





Basisonderzoek in de levenswetenschappen, dat is de kernactiviteit van VIB. Enerzijds de grenzen verleggen van wat we weten over moleculaire mechanismen, hoe deze mechanismen levende wezens zoals mensen, dieren, planten en micro-organismen regelen, en anderzijds zorgen voor tastbare resultaten die bijdragen aan een betere samenleving.

Gestoeld op een partnerschap met vijf Vlaamse universiteiten - UGent, KU Leuven, Universiteit Antwerpen, Vrije Universiteit Brussel en Universiteit Hasselt – en een stevig investeringsprogramma, bundelt VIB de expertise van 75 onderzoeksgroepen in één instituut. Het techtransfer-team van VIB vertaalt proactief biologische inzichten in nieuwe economische activiteiten die op hun beurt weer kunnen leiden tot nieuwe producten, medicijnen e.d. die kunnen gebruikt worden in de geneeskunde, landbouw en tal van andere toepassingen.

VIB neemt ook actief deel aan het publieke debat over biotechnologie door het ontwikkelen en verspreiden van een breed scala aan wetenschappelijk onderbouwde informatie over alle aspecten van de biotechnologie.

Meer info op www.vib.be.

VIB

Rijvisschestraat 120
9052 Ghent
Belgium
Tel. +32 9 244 66 11
Fax +32 9 244 66 10
info@vib.be
www.vib.be