

BIJLAGE 1: GEZONDHEIDS- EN LEEFMILIEURISICOBEOORDELING

In deze bijlage wordt een antwoord gegeven op de vragen zoals die door de wetgever worden gesteld in het kader van de gezondheids- en leefmilieurisicobeoordeling en wordt tevens een voor het dossier samenvattende risico-analyse gegeven.

1. Waarschijnlijkheid dat de genetisch gewijzigde populieren persistenter worden dan de recipiënte of de ouderplanten in landbouwgebieden of invasiever in natuurlijke habitats.

De genetisch gewijzigde populieren hebben een gewijzigde houtsamenstelling. Het aandeel lignine in het hout is met 19-25% verlaagd en het aandeel cellulose is als gevolg hiervan met 8-13% gestegen. Lignine is een complexe polymeer die opgebouwd wordt uit verschillende monolignolen. Door de hoeveelheid CSE enzym te verlagen, is ook de samenstelling van het lignine zelf lichtjes gewijzigd. Er zijn ook in de natuur in populier en in andere boomsoorten mutaties aangetroffen in genen betrokken bij de biosynthese van lignine, met wijziging van de houtsamenstelling tot gevolg. Populier is van zichzelf geen invasieve plant en er zijn geen aanwijzingen dat bomen met dergelijke mutaties persistenter of invasiever zijn.

Uit eerdere proeven met lignine-gemodificeerde populieren zijn in de meeste gevallen geen verschillen gevonden met conventionele populieren voor wat betreft de voortplantingswijze en/of snelheid van voortplanting. Een uitzondering wordt gevormd door de CAD-gemodificeerde populieren in de eerdere veldproef B/BE/13/V1. In deze bomen werd een vervroegde bloei waargenomen. Er verscheen al een heel enkele bloem op tweejarig hout en iets meer bloemen op driejarig hout, terwijl dit op wildtype bomen niet werd waargenomen. Het ging in dit geval om vrouwelijke bomen en dus vrouwelijke bloemen. Of er eventueel verschillen tussen lignine-gemodificeerde en wildtype bomen zijn in de verspreiding van zaden is men niet kunnen nagaan omdat de bloemen steeds zijn geplukt voordat deze volgroeid waren. De eerdere veldproeven met lignine-gemodificeerde populieren lijken te suggereren dat er geen wijziging is opgetreden in het vermogen om te overleven.

2. Selectieve voordelen of nadelen die op de populieren zijn overgedragen.

Uit serreproeven die met de genetisch gemodificeerde populieren zijn uitgevoerd zijn geen aanwijzingen naar voor gekomen dat op de bomen selectieve voor- of nadelen zijn overgedragen. Ze groeien in die omstandigheden op vergelijkbare wijze als wildtype populieren.

3. Kans op genoverdracht op dezelfde of andere seksueel compatibele plantensoorten onder de omstandigheden van het planten van de genetisch gewijzigde populieren, en selectieve voordelen of nadelen die op die plantensoorten kunnen worden overgedragen.

De kans op overdracht van genetisch gewijzigd materiaal op seksueel compatibele populieren is zo goed als onbestaande. De takken op de bomen zullen niet ouder dan 3 jaar worden wat betekent dat de kans klein is dat er gedurende de veldproef bloemen gevormd worden. De populier begint normaalgesproken pas na 5 tot 8 jaar te bloeien, en het is de leeftijd van de tak die bepaalt wanneer deze gaat bloeien, niet de leeftijd van de onderstam. Zoals onder 1. al is aangegeven is die kans echter niet nul, getuige het feit dat in veldproef B/BE/13/V1 met in het CAD-enzym gemodificeerde bomen in Wetteren gedurende de proef wel een aantal bloemen werd aangetroffen. In veldproef B/BE/07/V2 met CCR-gemodificeerde bomen in Zwijnaarde werd nooit een bloem aangetroffen. Genoverdracht zal voorkomen worden door eventuele bloeiwijzen tijdig te verwijderen, ruimschoots voordat ze eventueel zaden zouden kunnen verspreiden. De bomen in kwestie kunnen geen pollen verspreiden aangezien het vrouwelijke bomen zijn die geen mannelijke bloeiwijzen kunnen aanmaken.

De tweede mogelijke verspreidingsweg via wortelstekken is ook afgedekt. Eventuele wortelstekken zullen worden vernietigd, ook de eventuele wortelstekken die na de proef nog zouden kunnen ontstaan uit eventueel achtergebleven wortelresten. De monitoring zal plaatshebben totdat er een

volledig jaar geen bomen meer zijn opgekomen uit wortelstekken en er voldoende zekerheid is dat er geen genetisch gewijzigde bomen meer zullen opkomen. Het opkomen van eventuele wortelstekken is beperkt tot de locatie van de proef. Wij concluderen dat de wijze van uitvoering van de proef tot gevolg heeft dat er geen overdracht van genetisch gewijzigd materiaal kan plaatshebben op seksueel compatibele populieren en dat er dus ook geen sprake zal kunnen zijn van overdracht van eventuele selectieve voordelen of nadelen.

4. Eventuele genoverdracht van de planten naar micro-organismen

Succesvolle genoverdracht van de genetisch gemodificeerde planten naar micro-organismen wordt bijzonder onwaarschijnlijk geacht. De mogelijkheden voor horizontale genoverdracht zijn in verschillende wetenschappelijke experimenten onder laboratoriumcondities uitgetest. In de meeste, zoniet alle gevallen is in de experimentele opzet sprake geweest van enige homologie tussen de in de planten geïntroduceerde sequenties en sequenties aanwezig in de potentieel ontvangende bacteriën. In dergelijke laboratoriumomstandigheden is enige horizontale genoverdracht waargenomen. In reële veldcondities zullen dergelijke omstandigheden niet bestaan, of zijn ze op zijn minst bijzonder onwaarschijnlijk. Als er al horizontale genoverdracht plaatsheeft, dan moet dit het gevolg zijn van non-homologe recombinatie. Want ook overdracht als gevolg de aanwezigheid van de *attB1* en *attB2* sequenties wordt bijzonder onwaarschijnlijk geacht. De kans op opname van planten-DNA dat voldoende intact is, in een bacterie, is bijzonder klein. Daarbovenop is de kans dat een actief integrase-excisionase complex in een micro-omgeving waarin voldoende intact planten-DNA aanwezig is en waarin bovendien DNA-moleculen aanwezig zijn waarin de *attP1* en *attP2* sequenties aanwezig zijn, bijzonder klein. De kans op succesvolle genoverdracht wordt verkleind door het feit dat de *attB1* en *attB2* sequenties die aanwezig zijn in het construct, gemuteerd zijn ten opzichte van de wildtype *attB* sequenties waarvan ze ooit afgeleid zijn.

Eventuele horizontale genoverdracht zal ook niet kunnen leiden tot ongewenste milieu- of gezondheidseffecten. De korte sequenties die afgeleid zijn van het CSE gen en verantwoordelijk zijn voor de formatie van CSE hairpin RNA moleculen hebben buiten organismen die niet het identieke CSE gen bevatten geen effect, en de sequenties die coderen voor de NPT-II en CAT (cm^R) eiwitten zijn onder micro-organismen al zodanig wijd verspreid in de natuur dat eventuele overdracht naar micro-organismen geen betekenis heeft.

5. Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde leefmilieueffecten van de directe en indirecte interacties tussen de genetisch gewijzigde populieren en doelwitorganismen, zoals predatoren, parasitoïden en ziekteverwekkers (indien van toepassing).

Niet van toepassing. De modificatie die in de bomen is aangebracht is niet gericht op een bepaald doelwitorganisme. De bomen zijn enkel aangepast in hun houtsamenstelling.

6. Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde leefmilieueffecten van de directe en indirecte interacties tussen de genetisch gewijzigde populieren en niet-doelwitorganismen, inclusief de effecten op de populatieniveaus van concurrenten, planteneters, symbionten, parasieten en ziekteverwekkers.

De populier kan in interactie staan met blad- of houtetende insecten. De populier kent ook interacties met bacteriën en schimmels, waaronder pathogene bacteriën en schimmels, met name schimmels die roestziekten veroorzaken. Schimmels spelen ook een belangrijke rol nadat de bomen zijn afgestorven. Zij zullen het hout immers langzaam afbreken. Het is niet onmogelijk dat de gemodificeerde bomen gemakkelijker zouden worden afgebroken door verschillende in de natuur voorkomende schimmels. In een recent onderzoek naar afbraak in een aquatisch milieu bleken de bladeren van CAD-gemodificeerde populieren juist iets minder snel te worden afgebroken. Op basis van de tot nu toe opgedane kennis wordt ingeschat dat milieuomstandigheden een grotere impact hebben op de afbraaksnelheid dan een lichte wijziging van de houtsamenstelling (Halpin et al., Genetically Modified Lignin below Ground, Letter to Nature Biotechnology). Uit onderzoek dat uitgevoerd is met materiaal uit de veldproef B/BE/07/V2 is gebleken dat een gewijzigde

houtsamenstelling geen significant effect heeft op de aantallen en de soortenrijkdom van de micro-organismen in de rhizosfeer. Er werd wel een kleine, maar significante wijziging aangetroffen in de samenstelling van bacteriën die zich in stengel of wortel bevinden.

Het is daarnaast natuurlijk niet volledig uit te sluiten dat als gevolg van insertie van het donormateriaal op een ongunstige locatie in het genoom van de plant, ongewenste effecten zijn opgetreden die op dit moment nog niet gekend zijn. De kans hierop is relatief klein doordat de huidige lijnen geselecteerd zijn geweest uit een reeks transformanten op basis van gewenste fenotypische eigenschappen. Bomen met ongewenste eigenschappen zijn geëlimineerd.

7. Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde effecten op de menselijke gezondheid van mogelijke directe en indirecte interacties tussen de genetisch gewijzigde populieren en personen die werken met, in contact komen met of in de nabijheid komen van de introductie.

Deze en vergelijkbare genetisch gewijzigde bomen met een wijziging in hun houtsamenstelling worden al vele jaren in laboratoria, in serres, maar ook in veldproeven door mensen gehanteerd zonder enig negatieve effect voor hun gezondheid. Er zijn ook geen redenen om te veronderstellen dat een wijziging in de samenstelling van het hout zal leiden tot enige toxische, allergische of andere schadelijke effecten. De blootstelling aan het gemodificeerde materiaal beperkt zich tot het manueel manipuleren van het materiaal en het in contact komen met verhakseld materiaal. Het hout uit de proef wordt niet op een wijze verzaagd die houtstof zou kunnen opleveren en er zal om die reden ook geen blootstelling zijn aan houtstof dat ingeademd zou kunnen worden.

De aanwezigheid van de *NPT-II* en *Cm^R* genen in de planten wordt ook niet geacht te leiden tot een negatief effect op de menselijke gezondheid. EFSA heeft geoordeeld dat de toepassing van het *NPT-II* en *Cm^R* genen in genetisch gemodificeerde gewassen onschadelijk is. In dit geval is er bovendien geen consumptie van het materiaal.

8. Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde effecten op de gezondheid van dieren en effecten op de voeder/voedselketen van consumptie van de genetisch gewijzigde populieren en alle daarvan afgeleide producten indien deze voor diervoeder bestemd zijn.

Het hout van de genetisch gewijzigde populieren is noch voor de consumptie van mensen noch voor de consumptie van dieren bestemd. Hout wordt niet in voeding of diervoeder verwerkt en wordt in aparte kanalen verwerkt tot papier, meubels en andere houten gebruiksvoorwerpen. Hout wordt daarnaast ook verbrand. Wij sluiten echter niet uit dat occasioneel een afgewaaid blad zal worden opgegeten door een passerend dier.

9. Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde effecten op biogeochemische processen ten gevolge van mogelijke directe en indirecte interacties van de genetisch gewijzigde populieren en doelwit- en niet-doelwitorganismen in de nabijheid van de introductie.

Wij voorzien geen bijzondere interacties met of effecten op het abiotische leefmilieu.

10. Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde, directe en indirecte leefmilieueffecten van de teelt-, de beheers- en oogsttechnieken die specifiek worden gebruikt voor de genetisch gewijzigde populieren, indien deze verschillen van de voor niet gewijzigde populieren gebruikte technieken.

Het gemodificeerde hout wordt op dezelfde manier geteeld en verwerkt als gebruikelijk is voor normale houtbiomassaproductie; in dit geval op de manier zoals gebruikelijk voor zogenoemde korte-omloopvegetatie. Er zijn dus geen specifieke teelt-, beheers- of oogsttechnieken en de te voorzien effecten zijn gelijk aan die van de normale korte-omloop houtbiomassaproductie.

10. Samenvattende risico-analyse

De ontvangende plant of ouderplant

Grauwe abeel (*Populus x canescens*) is een overjarige plant die normaal pas na 5 tot 8 jaar begint te bloeien. Het is een hybride ontstaan uit de kruising tussen *Populus tremula* en *Populus alba*. Grauwe

abeel is tweehuizig en allogaam, dat wil zeggen dat de bomen mannelijk of vrouwelijk zijn. Het zijn kruisbevruchtende windbestuivers. Populieren produceren grote hoeveelheden stuifmeel dat over grote afstand met behulp van de wind kan worden verspreid. De bomen produceren fijne zaden die verpakt zitten in een katoenpluis. De zaden worden via de wind verspreid over relatief grote afstanden. In dit geval worden vrouwelijke bomen gebruikt wat betekent dat ze geen stuifmeel kunnen produceren. Een tak van een grauwe abeel kan onder natuurlijke omstandigheden, in tegenstelling tot bepaalde andere populierensoorten of wilgen, niet zomaar wortel schieten. Dat lukt enkel onder optimale omstandigheden met toepassing van stekpoeder. Grauwe abeel kan wel gemakkelijk wortelstekken maken, dat wil zeggen dat vanuit een oppervlakkig liggende wortel een scheut opschiet die een nieuwe boom kan vormen (een kloon).

Er komen in Vlaanderen wilde populieren voor, maar bovenal heel veel door de mens aangeplante populieren. In de meeste gevallen gaat het om euramerikaanse hybriden, maar ook grauwe abelen zijn in beperkte mate aangeplant. Grauwe abeel kan uitkruisen met bepaalde in Vlaanderen voorkomende populieren (o.a. *P. alba*, *P. tremula*, *P. x canescens*).

Doelstelling en ontwerp van de veldproef

De proef vindt plaats in het kader van wetenschappelijk onderzoek dat wil bijdragen tot de overschakeling naar een meer duurzame, op hernieuwbare grondstoffen gebaseerde economie. In de veldproef zullen twee genetisch gewijzigde lijnen (twee onafhankelijke transformanten, gemaakt met hetzelfde construct) worden gegroeid in een gerandomiseerd blokdesign, waarbij per lijn 48 bomen zullen worden uitgeplant in zogenoemde 'korte omloopvegetatie', aangevuld met 48 bomen van de ouderlijn. Het voornaamste doel is na te gaan of de populieren ook in normale buitenomstandigheden normaal groeit en hout produceert dat gemakkelijker kan worden omgezet in suikers, bioethanol en andere nuttige producten. De korte omloopvegetatie houdt in dat de bomen feitelijk als een soort struik worden geteeld. Ze worden dicht opeen geplant en na een eerste jaar dicht bij de grond afgeknippt om vervolgens met meerdere takken opnieuw uit te spruiten. Die takken worden dan na drie jaar geoogst en daarna wordt de veldproef beëindigd.

De genetische modificatie en de moleculaire karakterisatie daarvan

De bomen hebben een gewijzigde ligninesamenstelling als gevolg van de onderdrukking van het CSE-enzym door middel van RNAi. CSE (caffeoyl shikimate esterase) is betrokken in phenylpropanoid en monolignol biosynthese. Het construct dat in de planten is binnengebracht zorgt voor de aanmaak van een zogenoemd CSE hairpin-RNA-molecuul dat een mechanisme in gang zet dat tot gevolg heeft dat CSE-RNA-moleculen worden afgebroken. De hoeveelheid CSE-RNA-moleculen in de gemodificeerde bomen ligt 65 tot 70% lager dan in wildtype bomen. Er wordt als gevolg hiervan veel minder CSE-enzym geproduceerd. Naast het CSE hairpin-construct zijn in de planten ook de *NPT-II* en *Cm^R*-genen geïntroduceerd. Het *NPT-II* gen komt in de planten tot expressie en maakt de planten bestand tegen de werking van het antibioticum kanamycine. Dit gen heeft de functie van selectiemerker, die de selectie van planten die de modificatie hebben opgenomen erg vergemakkelijkt. Het *Cm^R*-gen komt in de planten niet tot expressie aangezien het onder controle staat van zijn natuurlijke bacteriële expressiesignalen.

Moleculaire karakterisatie heeft aangetoond dat het genconstruct in hpCSE#1 in drie genkopijen aanwezig is, terwijl het in hpCSE#2 in één genkopij aanwezig is. In beide lijnen zijn geen sequenties aanwezig afkomstig uit de 'backbone' van het voor de modificatie gebruikte genconstruct.

Potentiële risico's als gevolg van de geplande veldproef

Potentiële risico's voor de gezondheid van mens of dier

Er zijn geen redenen om te veronderstellen dat een gewijzigde houtsamenstelling een toxisch, allergeen of ander schadelijk effect zou hebben op de menselijke gezondheid. Pollen van populier staat bekend als een gematigd allergeen, maar omdat de modificatie aangebracht is in vrouwelijke bomen die geen pollen kunnen produceren kan er in deze bomen geen sprake zijn van een effect op

pollenallergeniteit. Mutaties in genen betrokken bij de lignine biosynthese komen in de natuur ook al voor, evenals de daardoor veroorzaakte wijziging in de houtsamenstelling.

De aanwezigheid van de antibioticumresistentiegenen *NPT-II* en *Cm^R* brengen ook geen onaanvaardbare risico's met zich mee. De kans dat potentieel schadelijke bacteriën een *NPT-II* gen uit de plant opnemen en zodanig wijzigen dat het functioneel is in de bacteriën, is bijna onvoorstelbaar. Daarnaast is het zo dat resistentiegenen tegen het antibioticum kanamycine wijd verspreid zijn in de natuurlijke microflora, wat betekent dat de kans dat een bacterie zo'n gen oppikt uit de natuurlijke microflora vele malen groter is dan dat het zo'n gen oppikt uit een genetisch gewijzigde plant. Een vergelijkbare redenering geldt voor het *Cm^R*-gen. Resistentie tegen chloramphenicol komt in de natuur heel veel voor en wordt in veel gevallen veroorzaakt door het *Cm^R* (*cat*)-gen. Het feit dat het *Cm^R*-gen in de natuur op het zeer mobiele Tn9 transposon voorkomt, maakt dat de kans dat een bacterie een dergelijke resistentie uit de natuur oppikt vele malen groter is dan dat een bacterie die uit de gewijzigde plant zou oppikken.

Potentiële risico's voor het leefmilieu

De genetisch gewijzigde bomen worden in de veldproef geteeld in zogenoemde 'korte omloop vegetatie', wat betekent dat de takken op de bomen nooit ouder dan drie jaar worden en daarom de kans klein is dat ze ooit zullen bloeien. Mochten er toch bloemen verschijnen dan zullen die worden verwijderd voordat ze zaden zouden kunnen verspreiden. Verspreiding via pollen is uitgesloten omdat het in dit geval om vrouwelijke bomen gaat die geen pollen kunnen produceren. Eventuele verspreiding via wortelstekken wordt eenvoudigweg voorkomen door een eventuele wortelstek die verschijnt af te steken en te vernietigen. De proef wordt bovendien omringd door een rij van niet-gewijzigde bomen die voorkomt dat het wortelstel van de gemodificeerde bomen tot buiten de proef geraakt. Mocht er eventueel een tak afwaaien, dan is ook dat geen probleem, omdat de kans verwaarloosbaar klein is dat takken van de grauwe abeel in de natuur spontaan zullen stekken. De bufferrij met niet-gewijzigde bomen zal er bovendien voor zorgen dat een eventuele afgebroken tak niet buiten de proef zal geraken. Eventueel afgebroken takken zullen worden vernietigd.

Uit eerder onderzoek met lignine-gemodificeerde bomen is gebleken dat dergelijke modificaties geen effect hebben op schimmelpopulaties in de bodem, bij de wortel en de ectomycorrhizae. Wel zou de modificatie een effect kunnen hebben op de snelheid waarmee materiaal van de bomen wordt afgebroken, en kan de modificatie een effect hebben op de samenstelling van de bacteriële populaties in de plant, hetgeen logische gevolgen zijn van een wijziging van de samenstelling van de lignine. Er zijn geen aanwijzingen dat er gevolgen zouden zijn voor afbrekende insecten. Er wordt op basis van het tot nu toe uitgevoerde onderzoek ingeschat dat andere factoren zoals variaties in de milieuomstandigheden een grotere impact op de afbraaksnelheid hebben dan een lichte wijziging van de houtsamenstelling.

Beheer, monitoring en controle

Er zal in de proef regelmatig gemonitord worden. Algemene monitoring, monitoring op afwezigheid van bloeiwijzen, en monitoring op eventuele wortelstekken (die zullen worden vernietigd). Tussen het aanplanten en de oogst vindt in principe alleen onkruidbestrijding plaats (manueel of met toepassing van een herbicide), en die zal worden vergemakkelijkt door een laag van boomschors te voorzien. Na de finale oogst zullen ook de boomstronken zo zorgvuldig mogelijk worden verwijderd en vernietigd. Daarna volgt een jaar braakligging en monitoring op wortelstekken totdat er een volledig jaar geen wortelstekken meer zijn waargenomen.

Conclusie

Op grond van de eigenschappen van de ouderplant, de genetische modificatie en zijn effecten, en de manier waarop de veldproef wordt uitgevoerd concluderen we dat de kans dat de voorgestelde veldproef een nadelig effect zou hebben op de gezondheid van mens, dier en leefmilieu, verwaarloosbaar klein is.

BIJLAGE 2: GEDETAILEERDE BESCHRIJVING VAN DE GENETISCHE MODIFICATIE

A. DE RECIPIËNT

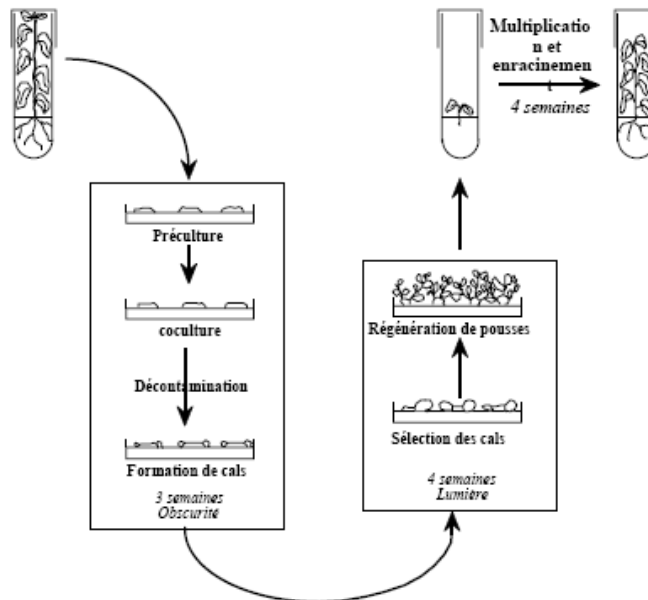
- a) familie: Salicaceae
- b) genus: *Populus*, sectie Leuce (nieuwe naam: *Populus*). Subsectie *Albidea*
- c) species: *Populus tremula* x *Populus alba* (*Populus* x *canescens*)
- d) subspecies: -
- e) cultivar/teeltlijn: 717-1-B4, vrouwelijke kloon
- f) gangbare naam: grauwe abeel

B. DE TRANSFORMATIE

B1. Gebruikte *Agrobacterium tumefaciens*

De genetisch gewijzigde bomen zijn verkregen door middel van *Agrobacterium tumefaciens* gemedieerde genetische modificatie. Genetisch gemodificeerde *Agrobacterium tumefaciens* is in cocultuur gebracht met bipten van plantenweefsel, afkomstig van de vrouwelijke populierenlijn 717-1-B4, waarna mbv *in-vitro* micropropagatietechnieken transgene populieren geregenereerd zijn, onder toepassing van selectiedruk met behulp van het antibioticum kanamycine.

Schematische voorstelling van de *A.tumefaciens* gemedieerde transformatie van populier dmv co-cultivatie



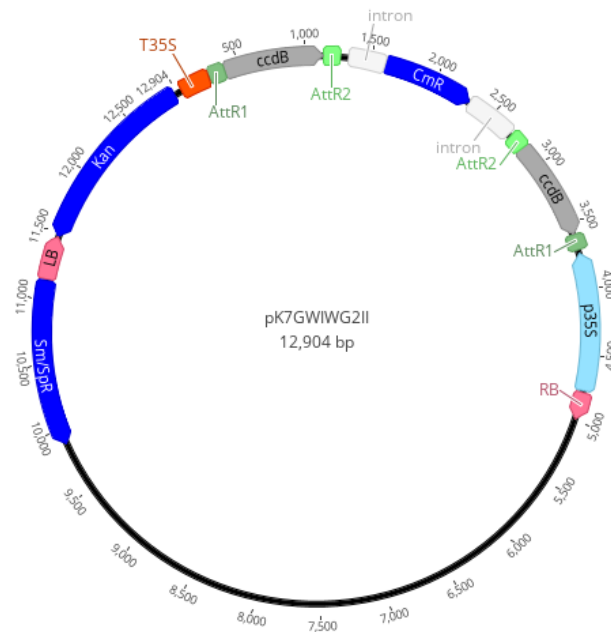
Overzicht van de stappen die uitgevoerd zijn ter verkrijging van de transgene populieren:

- 1.) Precultuur: weefselfragmenten van 2 maanden oude planten worden op een kweekbodem in het donker gepreconditioneerd gedurende 48h bij 24°C.
- 2.) Cocultuur: de weefselfragmenten worden gedurende 16h in contact gebracht met een 48h oude agrobacteriumcultuur.

- 3.) Decontaminatie: de weefselfragmenten worden gewassen om het grootste deel van de agrobacterium te verwijderen.
- 4.) Callusformatie: de weefselfragmenten worden op callusinducerende bodem geïncubeerd in aanwezigheid van ontsmettende antibiotica.
- 5.) Callus selectie: Idem + toevoeging van kanamycine voor selectie van genetisch gemodificeerde calli.
- 6.) Regeneratie van plantenscheuten: initiatie en elongatie van scheuten vanuit de calli op vast medium mbv thidiazuron, met aanwezigheid van ontsmettende en selecterende antibiotica.
- 7.) Vermenigvuldiging: vermenigvuldiging van gemodificeerde planten dmv stekken.

B2. De gebruikte vector

Voor de genetische modificatie is als basisvector gebruik gemaakt van de binaire vector pK7GWIWG2II (Karimi *et al.*, 2002, Trends Plant Sci.). Hieronder is een genetische kaart van de pK7GWIWG2II vector weergegeven.



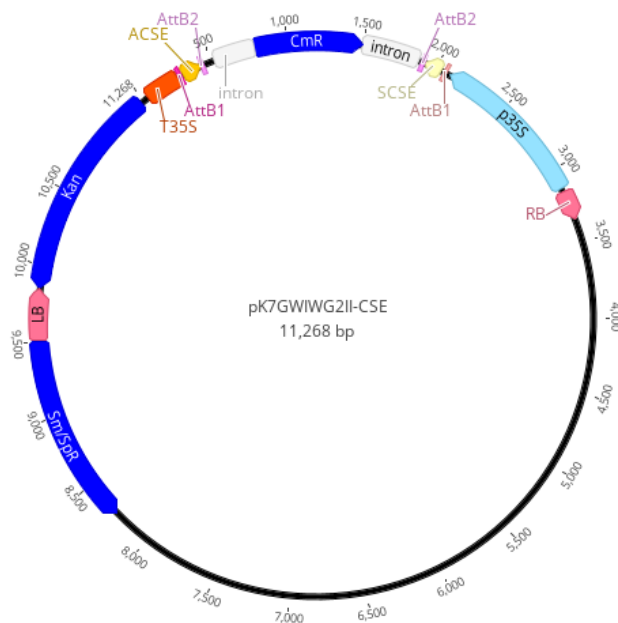
De belangrijkste elementen aanwezig op vector pK7GWIWG2II

Element	Functie	Origine
LB	T-DNA left border	Agrobacterium tumefaciens
T _{NOS}	Transcriptie terminator	Agrobacterium tumefaciens
Kan (<i>npt-II</i>)	Neomycine phosphotransferase gen onder <i>nopaline synthase</i> (<i>nos</i>) promotor en <i>nos</i> terminator. Verleent resistentie tegen kanamycine, neomycine.	Tn5
P _{NOS}	Promotor	Agrobacterium tumefaciens
T35S	Transcriptie terminator	Bloemkoolmosaïekvirus
AttR1	Recombinatiesite	Lysogene E.coli
ccdB	Cytotoxin protein B	E.coli F-plasmid
AttR2	Recombinatiesite	Lysogene E.coli
intron	Geselecteerd uit een Arabidopsis databank (ac007123.em_pl) op basis van de ideale kenmerken voor efficiënte splicing (A/T-rijk met een vertakkingsregio dicht bij de consensus).	Arabidopsis
Cm ^R (<i>cat</i>)	Verleent resistentie tegen chloramphenicol.	Tn9
AttR2	Recombinatiesite	Lysogene E.coli
ccdB	Cytotoxin protein B	E.coli F-plasmid
AttR1	Recombinatiesite	Lysogene E.coli
p35S	Promotor afkomstig van het bloemkoolmosaïekvirus	Bloemkoolmosaïekvirus

Element	Functie	Origine
RB	T-DNA right border	Agrobacterium tumefaciens
Sm/SpR (aadA)	Streptomycin adenyltransferase. Verleent resistentie tegen de antibiotica spectinomycine /streptomycine. Werkzaam in bacteriën.	E.coli

B3. De transformatievector

Via uitwisseling door middel van recombinatie zijn een tweetal elementen (SCSE-ACSE) in de pK7GWIWG2II vector ingebracht die tesamen instaan voor de productie van intron-spliced CSE hairpin-RNA. De verkregen transformatievector werd pK7GWIWG2II-CSE genoemd. Hieronder is een genetische kaart van de pK7GWIWG2II-CSE transformatievector weergegeven.



Elementen van pK7GWIWG2II-CSE transformatievector

Element	Grootte	Functie	Origine
LB	333 bp	T-DNA left border	Agrobacterium tumefaciens
T _{NOS}	255 bp	Transcriptie terminator	Agrobacterium tumefaciens
Kan (<i>npt-II</i>)	1397 bp	Neomycine phosphotransferase gen onder <i>nopaline synthase</i> (<i>nos</i>) promotor en <i>nos</i> terminator. Verleent resistentie tegen kanamycine, neomycine.	Tn5
P _{NOS}	306	Promotor	Agrobacterium tumefaciens
T35S	226 bp	Transcriptie terminator	Bloemkoolmosaïekvirus
AttB1	26 bp	Recombinatiesite	Lysogene E.coli
ACSE	120 bp	De eerste 120 bp van de <i>PtaCSE2</i> coderende sequentie (omgekeerde/antisense oriëntatie)	Populier
AttB2	26 bp	Recombinatiesite	Lysogene E.coli
intron	276 bp 377 bp	Geselecteerd uit een Arabidopsis databank (ac007123.em_pl) op basis van de ideale kenmerken voor efficiënte splicing (A/T-rijk met een vertakkingsregio dicht bij de consensus).	Arabidopsis
Cm ^R (cat)	703 bp	Verleent resistentie tegen chloramphenicol.	Tn9
AttB2	26 bp	Recombinatiesite	Lysogene E.coli
SCSE	120 bp	De eerste 120 bp van de <i>PtaCSE2</i> coderende sequentie (normale/sense oriëntatie)	Populier
AttB1	26 bp	Recombinatiesite	Lysogene E.coli
p35S	1036 bp	Promotor afkomstig van het bloemkoolmosaïekvirus	Bloemkoolmosaïekvirus

Element	Grootte	Functie	Origine
RB	200 bp	T-DNA right border	Agrobacterium tumefaciens
Sm/SpR (aadA)	1250 bp	Streptomycin adenylyltransferase. Verleent resistentie tegen de antibiotica spectinomycine /streptomycine. Werkzaam in bacteriën.	E.coli

B4. De transformanten die deel uitmaken van de veldproefaanvraag

N° van de event	Recipiënt	Gebruikt construct
hpCSE#1	717-1-B4	pK7GWIWG2II-CSE
hpCSE#2	717-1-B4	pK7GWIWG2II-CSE

C. DE SEQUENTIES AANWEZIG IN DE GENETISCH GEWIJZIGDE POPULIEREN

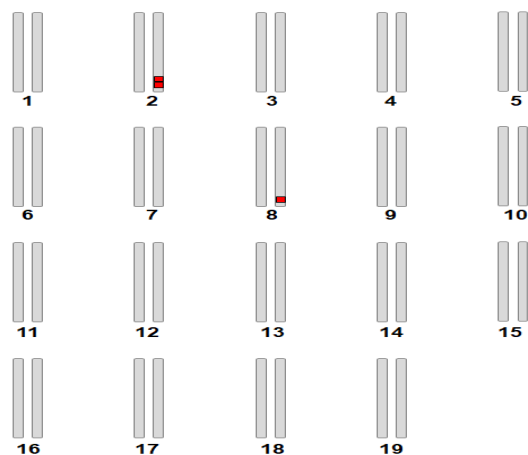
C.1. De plaats van insertie en aantal inserts

De insert is in alle populierlijnen geïnserieerd in het nucleair genoom. Met behulp van volledige genoomsequencing werd gekeken op welke plaats(en) in het nucleair genoom van populier geïnserieerde sequenties aanwezig waren. Hiervoor werd DNA met een hoog moleculair gewicht (HMG) geëxtraheerd uit hpCSE#1 en hpCSE#2 bladeren. Het bekomen HMG DNA werd vervolgens verwerkt tot een sequencerings *library* met behulp van het Oxford Nanopore Technologies ligatieprotocol (SQK-LSK109)¹. De bekomen library werd op de ONT MinION sequencer voor sequencing ingezet.

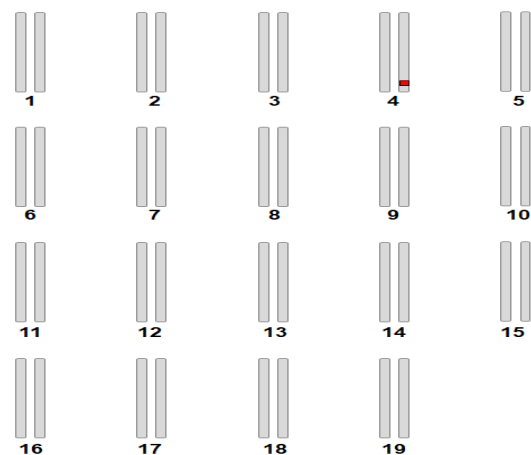
De resultaten van de sequencing van hpCSE#1 en hpCSE#2 populieren zijn weergegeven in onderstaande ideogrammen, die een schematische voorstelling zijn van de 19 homologe chromosomenparen (grijze balken) aanwezig in de nucleus. In hpCSE#1 werden 3 kopijen van de insert (rode blokjes) gevonden; twee kopijen zijn in tandem geïnserieerd in chromosoom 2, terwijl de derde kopij geïnserieerd is in chromosoom 8. In hpCSE#2 werd 1 kopij van de insert (rood blokje) geïnserieerd in chromosoom 4.

¹https://store.nanoporetech.com/media/wysiwyg/pdfs/SQK-LSK109/lambda-control-sqk-lsk109-CDE_9062_v109_rev1_23May2018.pdf

Ideogram hpCSE#1

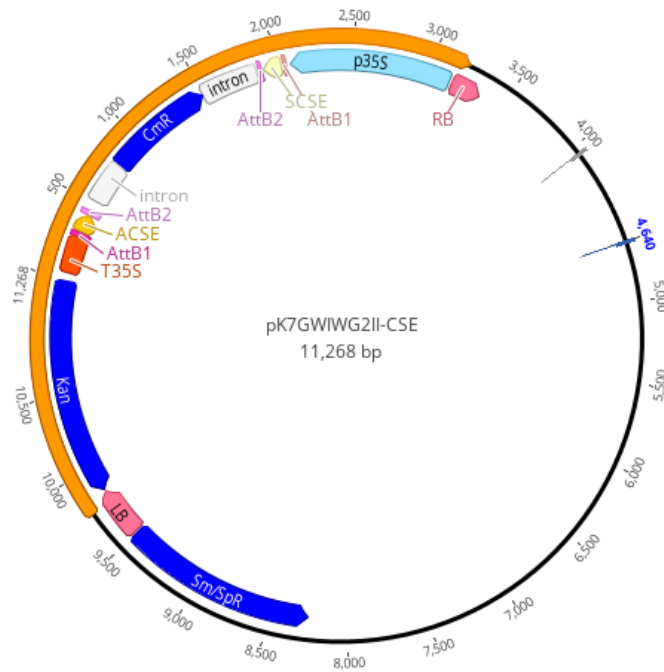


Ideogram hpCSE#2

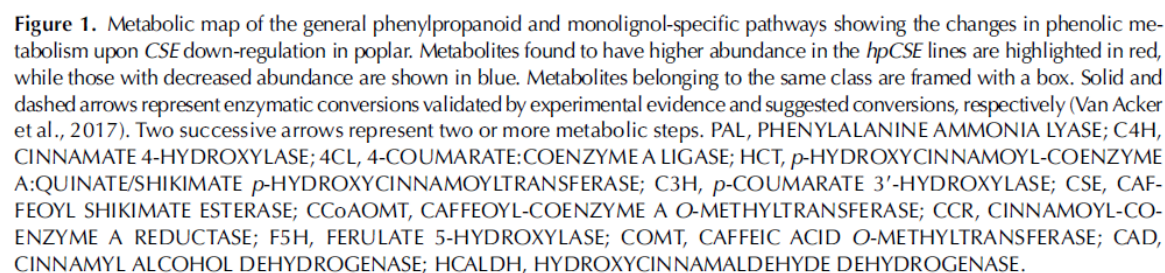


C.2. In de plant aanwezige sequenties

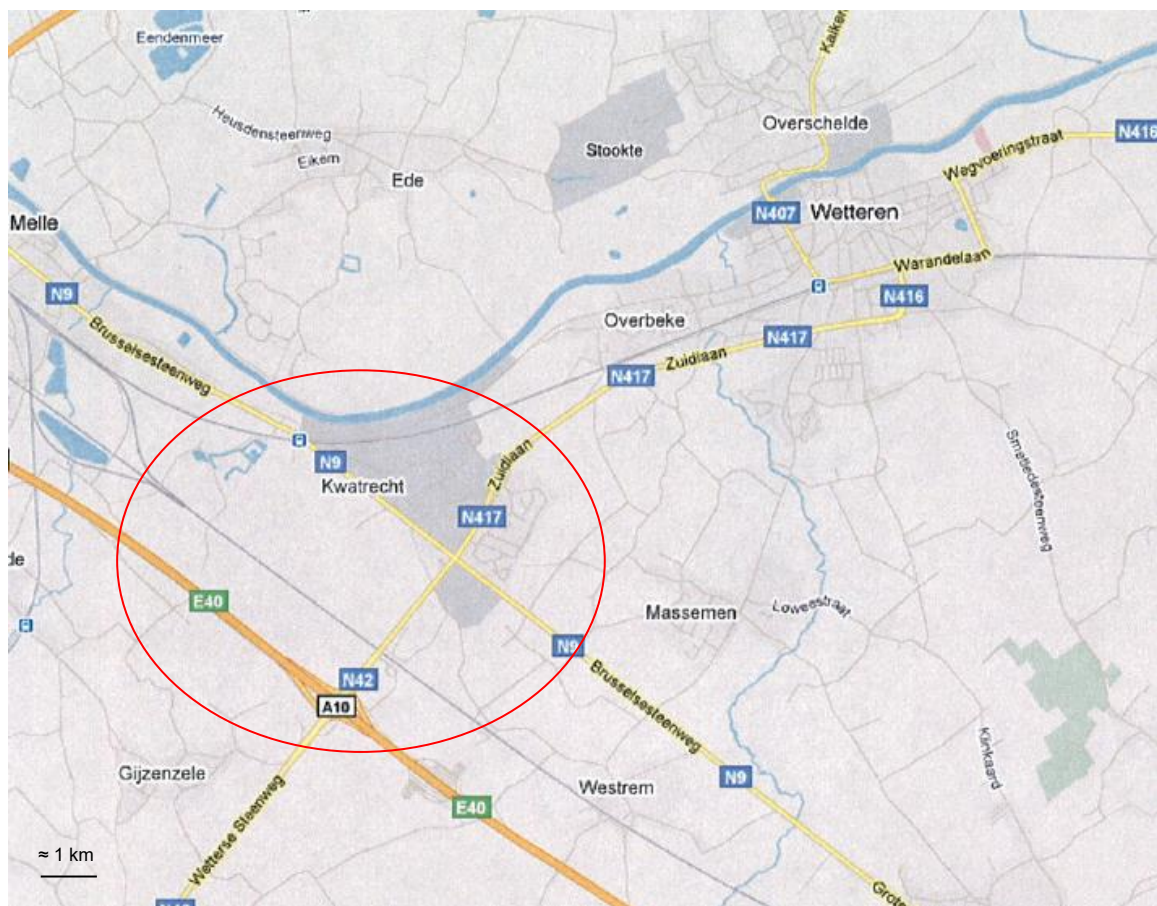
Vervolgens werd gekeken welke insert sequenties daadwerkelijk aanwezig zijn in hpCSE#1 en hpCSE#2. Allignering van alle reads met de volledige vectorsequentie toonde aan dat telkens hetzelfde deel van de vector geïnsereerd is (in alle kopijen aanwezig) in hpCSE#1 en hpCSE#2. Zoals hieronder aangeduid in het oranje werd telkens het deel tussen de left border (LB) en right border (RB) van het T-DNA in het genoom geïnsereerd. Van de borders zelf werd telkens nog een klein deel geïnsereerd in het genoom. Dit wil zeggen dat er geen spectinomycine genen (*aadA*) of andere backbone DNA sequenties in het genoom van hpCSE#1 en hpCSE#2 geïnsereerd zijn.



Uit: Saleme et al, 2017

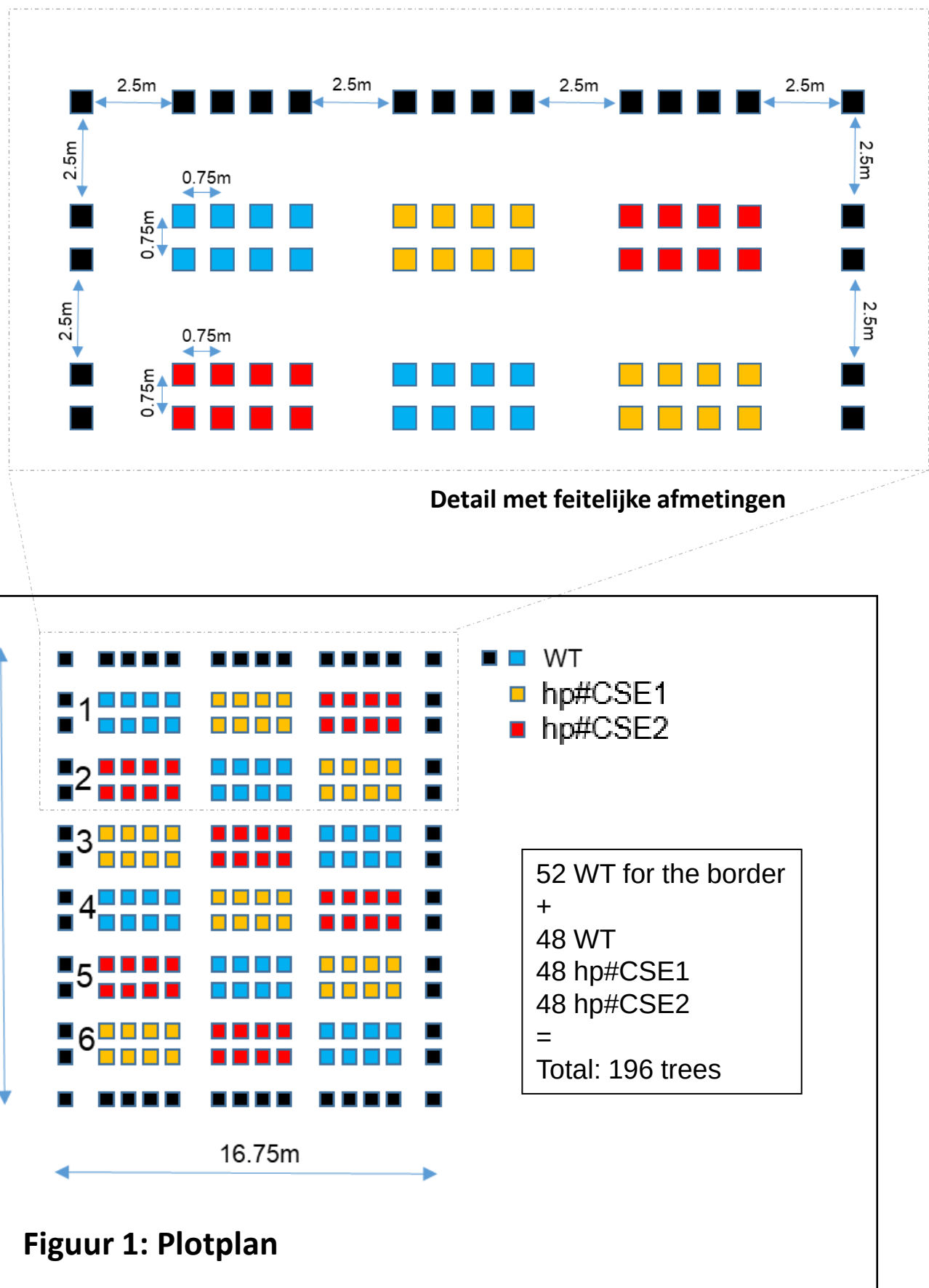


BIJLAGE 4: LIGGINGSPLAN



De veldproef bevindt zich binnen de op het plan aangeduide rode cirkel.

BIJLAGE 5: PLOTPLAN



BIJLAGE 6: PROEFPROTOCOL

1. Verantwoordelijkheden

De rechtspersoon VIB is de verantwoordelijke voor de proef.

2. Logboek

Er wordt een logboek bijgehouden waarin alle activiteiten die een onderdeel zijn van de proef worden geregistreerd. De volgende activiteiten worden gezien als onderdeel van de proef:

- Plantwerkzaamheden
- Onkruidbestrijding
- Inspecties van de proef (monitoring)
- Snoei-, oogst- en hakselwerkzaamheden
- Rooien van de boomstronken
- Inzaaien van een navolgend gewas
- Monitoringswerkzaamheden na afloop van de proef

Daarnaast zullen ook de volgende niet reguliere activiteiten in het logboek worden genoteerd:

- Bezoeken door personen waarbij de proef wordt betreden
- Calamiteiten zoals beschadiging van de omheining en stormschade

In het logboek zullen de volgende gegevens worden genoteerd:

- Datum
- Aard van de activiteit
- Uitvoerder van de activiteit
- Eventuele bijzonderheden

Een kopie van het logboek wordt als bijlage gevoegd bij het jaarlijks activiteitenverslag en het eindverslag van de proef.

3. Plantwerkzaamheden

De start van de plantwerkzaamheden wordt ten laatste een week van tevoren gemeld aan de Federale Overheidsdienst Volksgezondheid, Veiligheid van de Voedselketen en Leefmilieu. Voorafgaand aan de plantwerkzaamheden zal een grondbewerking plaatshebben met het doel de grond zo goed als mogelijk te homogeniseren en los te maken. De planten zullen in een gesloten voertuig in potten vanuit het VIB/UGent-onderzoeksgebouw in Zwijnaarde naar de veldproeflocatie in Wetteren worden vervoerd. Het planten van de bomen gebeurt manueel.

4. Gewas rondom de proef

Rond de proef zal elk jaar in het voorjaar rogge worden ingezaaid om zo de bodem te bedekken en een woekering van onkruid te voorkomen. Deze rogge zal kort gehouden worden door ze twee of drie keer per jaar te maaien. De rogge laat toe om buiten de proef gemakkelijk op wortelstekken te kunnen controleren.

5. Werkzaamheden tijdens de groeiperiode

Omdat de korte omloop vegetatie van de populieren wordt uitgevoerd als een duurzame lage input teelt, zal het aantal werkzaamheden tijdens de groeiperiode beperkt zijn.

Onkruidbestrijding

Onkruid zal manueel en/of door toepassing van herbiciden worden bestreden.

Monitoring

Er zal in de normale bloeiperiode (verschijnen van de eerste knoppen tot het volledig in blad staan) gemonitord worden op de vorming van bloemknoppen. Deze monitoring zal visueel gebeuren en wekelijks plaatshebben. In de rest van het jaar wordt minimaal 1 keer per maand gecontroleerd.

Na afloop van de proef zal drie keer per jaar gecontroleerd worden op wortelscheuten.

5. Oogst en vervoer van hout en houtchips

De oogst van de takken wordt ten laatste een week van tevoren gemeld aan de Federale Overheidsdienst Volksgezondheid, Veiligheid van de Voedselketen en Leefmilieu.

Met de geoogste takken kunnen de volgende dingen gebeuren:

Optie 1

Vervoerd worden naar het VIB/UGent-onderzoeksgebouw in Zwijnaarde of een andere locatie voor vermeerdering of biochemische analyse.

Optie 2

Ter plaatse verhakseld worden, waarna de houtchips in gesloten plastic tonnen worden vervoerd naar het VIB/UGent-onderzoeksgebouw of een andere locatie voor biochemische analyse, afbraaktesten, of omzetting in suikers en/of ander nuttige stoffen.

Het vervoer van takken zal zodanig plaatshebben dat de ongewenste verspreiding van takken wordt voorkomen: ofwel door het vervoer plaats te laten hebben in een gesloten vervoermiddel (langere afstanden), ofwel door de takken op een open manier te transporteren. Dit laatste zal enkel gebeuren voor het verplaatsen van zeer kleine hoeveelheden takken over zeer korte afstand (loopafstand) (voor analyse), waarbij ervoor wordt gezorgd dat er geen enkel materiaal verloren gaat.

Het vervoer van tonnen met houtchips zal plaatshebben in een gesloten vervoermiddel.

6. Vernietiging van materiaal dat niet gebruikt wordt

Materiaal dat niet wordt afgevoerd voor verder onderzoek zal ter plaatse worden verhakseld, op een hoop worden gelegd en worden afgedekt met een compostdoek om verspreiding van dit materiaal te verhinderen en de compostering van het materiaal te bevorderen. Als het materiaal voldoende gecomposteerd is wordt het ter plaatse verspreid en in de bodem ondergewerkt.

7. Volgende teelt

Na afloop van de veldproef zal de locatie gedurende één jaar braak liggen. Dit laat toe gemakkelijk te monitoren op eventuele wortelstekken. Daarna zal er een graangewas op worden gezaaid.

8. Afwijkingen

Eventuele afwijkingen van het proefprotocol worden onmiddellijk gecommuniceerd aan de Federale Overheidsdienst Volksgezondheid, Veiligheid van de Voedselketen en Leefmilieu.

9. Activiteitenverslag

Aan het einde van het kalenderjaar zal een kort activiteitenverslag worden opgemaakt, met daarbij in bijlage een kopie van het logboek. Dit activiteitenverslag wordt overgemaakt aan de Federale Overheidsdienst Volksgezondheid, Veiligheid van de Voedselketen en Leefmilieu.

10. Eindverslag

Na afloop van de laatste oogst van de proef wordt een eindrapport opgesteld van de proef naar het rapport format zoals beschreven in de EC beslissing 2003/701/EC.

Na het beëindigen van de post-release monitoring zal een finaal post-release monitoring rapport worden opgesteld.

Beide rapporten worden overgemaakt aan de Federale Overheidsdienst Volksgezondheid, Veiligheid van de Voedselketen en Leefmilieu.

BIJLAGE 7: MONITORINGSPLAN

Monitoring gedurende de proef

De proef zal visueel worden gecontroleerd. Deze visuele controle zal op regelmatige tijdstippen plaatshebben met een intensivering in de reguliere bloeiperiode van populieren (eerste knopvorming tot het moment dat de bomen in blad staan). Een wekelijkse controle zal dan plaatshebben om te verifiëren dat de transgene populieren niet gaan bloeien. In de overige periodes zal een keer per maand gecontroleerd worden.

Monitoring na afloop van de proef

Aan het eind van de proef zal de biomassa manueel geoogst worden en verhakseld voor analyse en/of verwerking tot glucose en/of andere producten zoals bioethanol. Resterende boomstronken zullen inclusief wortels machinaal worden verwijderd en verzaagd / verhakseld en gecomposteerd en/of ten dele worden afgevoerd als bedrijfsrestafval (ter verbranding).

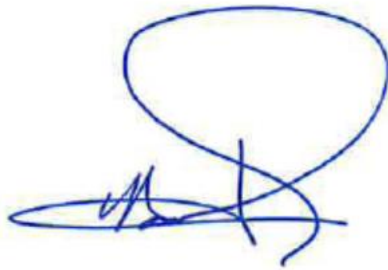
Na de proef zal er de plot een jaar braak liggen. In de jaren na afloop van de proef zal in de periode maart – augustus 3 maal worden gecontroleerd op eventuele uitschieters van populier. Aangetroffen uitschieters zullen met een effectief herbicide (bijv. Roundup, of een herbicide speciaal voor houtachtige gewassen) worden bestreden. Naar verwachting zullen er in het tweede monitoringsjaar geen uitschieters meer worden aangetroffen. De monitoring wordt gestaakt wanneer er een volledig jaar geen uitschieters meer zijn aangetroffen.

BIJLAGE 8: VERKLARING INZAKE BURGERLIJKE AANSPRAKELIJKHEID

Ondergetekende Jo Bury, managing director van VIB, verklaart dat VIB de volledige burgerlijke aansprakelijkheid op zich neemt voor wat betreft de schade die aangebracht zou worden aan de gezondheid van mens en dier, aan goederen of aan het leefmilieu als gevolg van de proefnemingen.*

Voor de bepaling van de burgerlijke aansprakelijkheid zal toepassing worden gemaakt van de regels neergelegd in de artikelen 1382 e.v. van het Burgerlijk Wetboek.

Datum: 7 januari 2020

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large loop at the top and several horizontal strokes below it.

Handtekening:

Jo Bury
Managing director, VIB

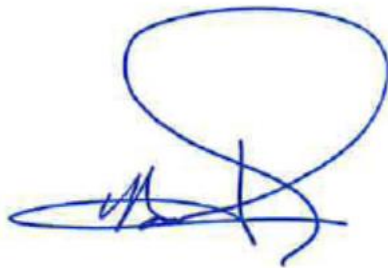
* VIB wenst expliciet te verwijzen naar de interpretatie van de vereiste voor een verklaring aangaande burgerlijke aansprakelijkheid zoals in het document van Augustus 2005 van BelgoBiotech, en zoals deze bevestigd is door de brief van de ministers Bruno Tobback en Rudy Demotte van 28 november 2005 met referte 53.336/L460/MD.

BIJLAGE 9: VERKLARING INZAKE LEVERING VAN CONTROLESTALEN

Ondergetekende Jo Bury, managing director van VIB, verklaart dat de VIB ten laatste 15 dagen na het begin van de proef aan de SBB de nodige controlestalen met de bijbehorende wetenschappelijke informatie zal bezorgen. De controlestalen zullen bestaan uit DNA afkomstig van de in de proef gebruikte genetisch gemodificeerde lijnen, met de nodige bijbehorende informatie.*

De controlestalen zullen geen gestandaardiseerde referentiestalen zijn.

Datum: 7 januari 2021

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large loop at the top and several horizontal strokes below it.

Handtekening:

Jo Bury
Managing director, VIB

* VIB wenst expliciet te verwijzen naar de interpretatie van de vereiste voor een verklaring aangaande levering van controlestalen zoals verwoord in het document van Augustus 2005 van BelgoBiotech, en zoals deze bevestigd is door de brief van de ministers Bruno Tobbac en Rudy Demotte van 28 november 2005 met referte 53.336/L460/MD.

BIJLAGE 10: Detectie en bepalingstechnieken

Om met zekerheid vast te stellen dat het om genetisch gewijzigde populier gaat kan een PCR-gebaseerde DNA-detectie worden uitgevoerd, waarvan hieronder de verschillende te volgen stappen worden weergegeven.

1. Isolatie van genomisch DNA

- Grind tissue is dissolved in approximately 500 µl of CTAB buffer.
- Incubate the CTAB/plant extract mixture for about 30 min at 55 °C in a thermomixer
- After incubation, spin the CTAB/plant extract mixture at 12000 g for 5 min to spin down cell debris. Transfer the supernatant to clean microfuge tubes.
- To each tube add 250 µl of Chloroform: Iso Amyl Alcohol (24:1) and mix the solution by inversion. After mixing, spin the tubes at 13000 rpm for 1 min.
- Transfer the upper aqueous phase only (contains the DNA) to a clean microfuge tube.
- To each tube add 1/10 vol of 3M Sodium Acetate followed by 2 volumes of ice-cold absolute ethanol.
- Invert the tubes slowly several times to precipitate the DNA. Generally the DNA can be seen to precipitate out of solution. Alternatively the tubes can be placed for 1 hr at -20 °C after the addition of ethanol to precipitate the DNA.
- Spin the tube at 13000 rpm for a minute to form a pellet. Remove the supernatant and wash the DNA pellet by adding two changes of ice cold 70 % ethanol.
- Remove all the supernatant and allow the DNA pellet to dry (approximately 15 min). Do not allow the DNA to over dry or it will be hard to re-dissolve.
- Resuspend the DNA in sterile DNase free water (approximately 50-400 µl H₂O; the amount of water needed to dissolve the DNA can vary, depending on how much is isolated). RNaseA (10 µg/ml) can be added to the water prior to dissolving the DNA to remove any RNA in the preparation (10 µl RNaseA in 10ml H₂O).
- After resuspension, the DNA is incubated at 65 °C for 20 min to destroy any DNases that may be present and store at 4 °C.

2. PCR Protocol

2.1. Te gebruiken primers

Sequentie (5' ---> 3')	Target	Annealing Temp (°C)	Lengte van PCR product (bp)
GGTTTCTCTGAGGAGCCAGTA	<i>Ptlf-gen</i>	54.2	71
GCCTCCCATGTCCCTCTTC			
TGTTCCGGCTGTCAGCGCAG	<i>nptII</i>	60	477
TCGGCAAGCAGGCATCGCCA			

2.2. PCR mix

10X PCR buffer	2.5 µl
MgCl ₂ (50mM)	2.5 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
forward primer (10µM)	1.5 µl
reverse primer (10µM)	1.5 µl
Taq polymerase (5U/µl)	0.4 µl
Milli-Q water	9.6 µl
DNA template (4 ng)	2 µl

2.3. PCR-programma:

Stap1	95°C	5 min	
Stap2	95°C	45 sec	
Stap3	Ta	45 sec	(Ta zoals aangegeven in Tabel onder 2.1.)
Stap4	72°C	1 min	
Stap5	72°C	10 min	

Stap 2 tot 4 veertig keer herhalen.

2.4. Gelelectroforese

DNA gelelectroforese van de gegenereerde DNA fragmenten, waarbij in een referentieraantje een DNA ladder wordt toegevoegd. Aanwezigheid van een DNA fragment van 477 bp in het PCR product duidt dan op de aanwezigheid van het NPTII gen, en dus dat het om transgeen materiaal ging. Het DNA kan zichtbaar gemaakt worden met behulp van verschillende aan DNA bindende kleurstoffen zoals Ethidiumbromide, Sybr Safe of Gel Green.

2.5. Controles

Er moeten voldoende positieve en negatieve controles worden meegenomen. Als negatieve controles kan bijvoorbeeld genomisch DNA worden gebruikt van ouderlijn 717-1B4, of enig andere niet-genetisch gewijzigde populierenlijn. En als positieve controle kunnen gebruikt worden het plasmide pHellsgate-sCAD, en genomisch DNA afkomstig van bijvoorbeeld de genetisch gemodificeerde lijn pHG8-CAD4. Het experiment moet minimaal in duplo worden uitgevoerd.

Summary Notification Information Format

A. General information

A1. Details of notification

Notification Number

B/BE/21/V1

Member State

Belgium

Date of Acknowledgement

.....

Title of the Project

Field evaluation of poplars with a modified wood composition

Proposed period of release:

15/05/2021 to 01/03/2025

A2. Notifier

Name of the Institute

VIB

A3. Is the same GMPT release planned elsewhere in the Community?

No.

A4. Has the same GMPT been notified elsewhere by the same notifier?

No

B. Information on the genetically modified plant

B1. Identity of the recipient or parental plant

- | | |
|------------------------------|--|
| a) family name: | Salicaceae |
| b) genus: | <i>Populus</i> , sectie <i>Populus</i> . Subsectie <i>Albidea</i> |
| c) species: | <i>Populus tremula</i> x <i>Populus alba</i> (<i>Populus</i> x <i>canescens</i>) |
| d) subspecies: | - |
| e) cultivar / breeding line: | 717-1B4, female clone |
| f) common name: | Grey poplar |

B2. Description of the traits and characteristics which have been introduced or modified, including marker genes and previous modifications

The genetically modified trees have an altered wood composition resulting from the

downregulation of the Caffeoyl Shikimate Esterase (CSE) enzyme through RNAi. They possess less lignin and more cellulose. CSE is involved in the synthesis of monolignols which are the basic building blocks of lignin. Poplar has two homologous CSE genes: PtaCSE1 and PtaCSE2. The downregulation results in a residual messenger RNA production of between 15 to 50% of the amount of messenger RNA produced in wildtype trees. The amount of lignin that is produced is reduced between 19 and 25%, and the relative amount of cellulose has increased with 8 to 13%. The composition of the lignin is slightly altered as well. There is a shift towards more so-called 'H-units' in the lignin polymer. The reduced amount of lignin together with its altered composition has a positive effect on the ease with which the lignin can be broken down to gain access to the valuable sugar content in the cellulose and hemicellulose in the wood of the trees. Such types of alterations to the wood composition exist in nature too. Natural mutations have for instance been found in enzymes involved in lignin biosynthesis in the U.S. in loblolly pine (*Pinus taeda*) and in wild black poplar in Europe resulting in comparable effects on the wood composition. The modified trees also carry the NPT-II and cmR genes. The NPT-II gene is present as a selection marker gene allowing easy selection of transformed plants. The cmR gene which codes for a bacterial resistance to the antibiotic chloramphenicol is not expressed in the plants and therefore does not convey any new properties to the plant.

B3. Type of genetic modification

Insertion of genetic material.

B4. In case of insertion of genetic material, give the source and intended function of each constituent fragment of the region to be inserted

The region which has been inserted, and which is flanked by the T-DNA borders from the Ti-plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* contains the following elements:

Element	Function	Origin
LB	T-DNA left border	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
T _{NOS}	Transcription terminator	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Kan (<i>npt-II</i>)	Neomycine phosphotransferase gene under control of the <i>nopaline synthase (nos)</i> promoter and <i>nos</i> terminator. Provides resistance to kanamycine, neomycine.	Tn5
P _{NOS}	Promotor	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
T35S	Transcriptie terminator	Cauliflower mosaic virus
AttB1*	Recombination site	Lysogenic <i>Escherichia coli</i>
ACSE	The first 120 bp of the <i>PtaCSE2</i> coding sequence (antisense orientation)	Poplar
AttB2*	Recombination site	Lysogenic <i>Escherichia coli</i>
intron	Selected from an Arabidopsis databank to achieve efficient splicing	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Cm ^R (cat)**	Provides resistance (in bacteria) against chloramphenicol. Not expressed in the plant.	Tn9
AttB2*	Recombination site	Lysogenic <i>Escherichia coli</i>
SCSE	The first 120 bp of the <i>PtaCSE2</i> coding sequence (sense orientation)	Poplar
AttB1*	Recombination site	Lysogenic <i>E. coli</i>
p35S	Promotor	Cauliflower mosaic virus
RB	T-DNA right border	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>

*the AttB1 and -2 recombination sites are synthetically altered versions of a recombination site originally isolated from *Escherichia coli*.

**the Cm^R gene is removed during splicing and is not present in the final hairpin RNA molecule that results in downregulation of the CSE gene.

B6. Brief description of the method used for the genetic modification

The method used for the genetic transformation is based on *Agrobacterium tumefaciens* cocultivation of excised internodes from in vitro grown poplar plantlets (Leplé et al., 1992). After this cocultivation step where the gene transfer takes place, the transformed cells are selected

using a positive screen (based on antibiotic resistance) and induced to regenerate a whole plant.

B7. If the recipient or parental plant is a forest tree species, describe ways and extent of dissemination and specific factors affecting dissemination

Grey poplar (*P. x canescens*) can disseminate vegetatively through the production of suckers from superficial roots. Pollen and seed are disseminated by the wind, possibly over rather long distance. The seed is very small and devoid of albumen: for this reason the seed viability in the wild is rather short (between 2 and 4 weeks). In fact, seed regeneration is not often observed as ecological conditions necessary for seed germination and plantlet development are seldom met: naked soil, no competition at all with any other species, full light, permanent humidity, but not in excess...

C. Experimental Release

C1. Purpose of the release

As already specified, the genetically modified poplars are modified in their lignin content. Lignin is very important for both tree growth and development, particularly for water conduction and mechanical support. Different transgenic lines of poplars with a modified lignin content have already been evaluated in previous field trials in the UK, France, and Belgium, for agricultural performances and for evaluation of the technological properties of wood for pulp and paper making. This release has the purposes to test the performance of these new CSE-downregulated poplar lines under real life conditions and to produce wood to evaluate its properties to serve as a good biomass source for extracting sugars and other valuable compounds. Lignin composition, lignin/cellulose ratio and the accessibility to cellulose are critical for the extraction of sugars from ligno-cellulosic feedstock. The poplar trees will be grown as a short rotation intensive culture using sustainable low-input conditions.

C2. Geographical location of the site

The field trial will take place on grounds belonging to the ILVO research institute in the municipality of Wetteren.

C3. Size of the site (m2)

The trial site is in total about 370 m2, which includes a surrounding non-GM buffer.

C4. Relevant data regarding previous releases carried out with the same GM-plant, if any, specifically related to the potential environmental and human health impacts from the release

The genetically modified plants have not been released before.

D. Summary of the potential environmental impact from the release of the GMPts

The environmental impact from the release is expected to be zero since it is expected that the GM poplars will not flower and any suckers from superficial roots will be destroyed. Spontaneous regrowing of trees from fallen branches is extremely unlikely, as it is known that *P.x canescens* and the clone 717-1-B4 does not easily shoot. Only under ideal conditions in the laboratory with the application of shooting powder, *P. x canescens* is able to shoot. This means that there will be no transfer of transgenes to native or cultivated poplars, and no spread of the GM poplars themselves. When poplar is grown in short rotation intensive culture the trunks and branches will not become older than three years, and therefore are not expected to flower. Grey poplar normally starts to flower between 5 – 8 years of age, only in some cases after 4 years. But anyhow, if monitoring would reveal any flowering, these flowers will be removed. For information:

The clone used as a recipient is a female clone, unable to produce male flowers and therefore also unable to produce pollen.

The modification of the trees is not expected to lead to environmentally relevant effects on non-target species. In former trials only some effects were identified on the composition of bacteria living in the trees. The amount and species diversity of micro-organisms living in the rhizosphere was not affected. From scientific literature it can be deduced that lignin modified trees do not have an effect on the interaction with pathogens, that there is no or very limited effect on leaf-eating insects, and that for the decay of lignin-modified wood other factors like environmental conditions, the chosen poplar species and clone have more significant effects than the lignin modification.

And as outlined above, there is no expected selective advantage of the GM poplar. It is more likely that the GM poplar will have a selective disadvantage.

The toxicity or allergenicity of the trees has not been tested, but there are no reasons to suspect that an altered wood composition resulting from a lower lignin and higher cellulose content would have an effect on the toxicity or the allergenicity of the plant. Allergenicity of poplar is mostly associated with pollen, but as we are working with female trees that do not produce pollen this is not a concern.

It is also known that trees with comparable alterations in the lignin content already exist in nature (in loblolly pine in the U.S. and in black poplar in Europe). If there would be any alteration of the way the modified trees interact with nature and in particular with non-target organisms, this altered interaction would be comparable with the interactions of those wild-type trees. Also, there are no indications from the loblolly pine and black poplar mutants that the modified wood would have any negative impact on the health of humans or animals.

E. Brief description of any measures taken for the management of risks

Grey poplar (*P. x canescens*) is dioecious (every tree is either male or female). The 717-1B4 clone is female. There is therefore no risk of dissemination through pollen. Moreover, as flower development occurs before vegetative bud burst and leaf development, it is very easy to identify and eliminate female catkins, before their full development. But as the modified poplars will be grown as short rotation intensive culture with a harvest of all trunks and branches after 3 years of growing, the GM poplars are not expected to flower. Suckers are also regularly monitored and destroyed by either removing them or killing them with a contact herbicide. After a storm the site will be inspected for possible fallen branches and these will be removed. The site is designed in such a manner that fallen branches will not disperse by wind from the plot and will remain within the boundaries of a fence surrounding the trial.

At the end of the trial, the rootstock will be mechanically removed and the soil will be worked with a rotary cultivator. The plot will be monitored for at least two years for suckers, which will be destroyed using a suitable contact herbicide. If necessary monitoring will be extended until there has been one year without any suckers.

The field trial plot will be surrounded by a 1.80 m high wire fence to prevent accidental trespassing and accidental removal or spread of GM material.

F. Summary of foreseen field trial studies focused to gain new data on environmental and human health impact from the release

There are no specific studies foreseen to gain new data on the environmental and human health

impact from the release other than the study of the phenotype and growth characteristics of the trees.

G. Final report

-

H. European Commission administrative information

I. Consent given by the Competent Authority:

Not known

Bijlage 13 bis Bewijs betaling dossiertaks

Crediteur 2000106722 FOD Volksgezondheid, Veiligheid en Voedselketen en Leefmilieu Victor Hortaplein 40 bus 10 1060 Brussel		Bankrelatie Bank van de Post SWIFT-code: PCHQBE88 IBAN: BE08 6792 0042 2713 Bankcode: 679 Rek.nummer: 679-2004227-13	
5000007230 390 RUG	ZR001 B Cred.: SEPA overschrijving 2000106722 5110000009 113/2100/00204 KV	FOD Volksgezondheid, Veiligheid en 14.01.2021 19.01.2021	3.500,00- EUR 3.500,00- 3.500,00- EUR *Dossiertaks - veldproefaanvraag