

KENNISGEVING GGO-VELDPROEFAANVRAAG

Technisch dossier

A. ALGEMENE INFORMATIE

A1. Kennisgever

VIB
Rijvisschestraat 120
9052 GENT
Tel.: 09 2446611
Fax.: 09 2446610
e-mail: vib@vib.be

A2. Naam, kwalificaties en ervaring van de verantwoordelijke wetenschapper(s).

Verantwoordelijke wetenschapper:

Prof.dr. Wout Boerjan
VIB-UGent Centrum voor Plantensysteembioogie
Technologiepark 927
9052 GENT

Kwalificaties: doctor in de wetenschappen, docent in eukaryote genetica en biotechnologie van bomen.

Ervaring: meer dan 25 jaar ervaring in de plantenbiotechnologie, meer dan 15 jaar ervaring met genetisch gewijzigde populieren, verantwoordelijk voor twee eerder uitgevoerd meerjarige veldproeven met genetisch gemodificeerde populieren.

Bioveiligheidscoördinator:

René Custers, MSc
VIB
Rijvisschestraat 120
9052 GENT

Kwalificaties: Msc in moleculaire wetenschappen

Ervaring: meer dan 25 jaar ervaring in bioveiligheid, zowel wat betreft ingeperkt gebruik als introductie in het leefmilieu. Als bioveiligheidscoördinator betrokken geweest bij 8 eerdere veldproeven.

A3. Titel van het project

Veldevaluatie van populieren met een gewijzigde houtsamenstelling

B. INFORMATIE OVER DE RECIPIËNTEN

B1. Volledige naam

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

B2. Informatie over de voortplanting

B2a) Voortplanting en generatietijd

i) Wijze(n) van voortplanting:

In hoofdzaak seksuele reproductie, maar ook mogelijkheid tot het vormen van vegetatieve uitlopers (met name wortelopslag). Daarnaast is de beworteling van afgewaaide takken niet geheel uitgesloten, vnl wanneer ze op zeer vochtige riviergronden terecht komen.

ii) Mogelijke specifieke factoren die van invloed zijn op de voortplanting;

De grauwe abeel is tweehuizig en allogaam. Iedere boom is ofwel mannelijk, ofwel vrouwelijk. De bestuiving van de vrouwelijke bloemen vindt plaats mbv de wind. De bloemen van de gebruikte vrouwelijke kloon 717-1B4 kunnen alleen bevrucht worden door het pollen van compatibele andere populieren van de sectie *Populus* die zich buiten de proef zouden bevinden. Ze produceren geen pollen.

iii) Generatietijd;

Onder optimale omstandigheden is de generatietijd minimaal 4 jaar (vroegste start van de bloei). Normaal gesproken gaat de populier voor het eerst bloeien na 5 tot 8 jaar.

B2b) Seksuele compatibiliteit met andere gekweekte of in het wild levende species, met inbegrip van de verspreiding in Europa van de compatibele species.

De transgene grauwe abeel is seksueel compatibel met een aantal andere populieren uit de sectie *Populus*: in het bijzonder *Populus alba*, *Populus tremula*, zijn hybriden *Populus* x *canescens*, en met de Amerikaanse soort *Populus tremuloides*.

P. alba, de witte abeel, komt voor in midden en Zuid-Europa, maar ook in de Benelux waar hij veel is aangeplant in parken en tuinen als sierboom.

P. tremula, de ratelpopulier of esp (aspen in het Engels), komt voor in Europa (OECD, 2001).

P. x canescens komt met name voor in West-, Midden- en Zuid-Europa (FAO, 1979).

P. tremuloides, de 'quaken aspen', komt voor in aangeplante vorm.

Het is voor de grauwe abeel quasi onmogelijk om te kruisen met bomen uit de andere secties van het genus *Populus* (zoals de secties *Aigeiros* en *Tacamahaca*) vanwege incompatibiliteitsfenomenen en verschillen in bloeifysiologie (Villar et Lemoine, 1993).

De grauwe abeel kan dus niet echt kruisen met de in onze contreien meest voorkomende populier; de euramerikaanse populier *P. x canadensis* (*P. deltoides* x *P. nigra*), de interamerikaanse populier *P. x interamericana* (*P. deltoides* x *P. trichocarpa*), *P. simonii*, *P. trichocarpa* en ook niet met de hier in het wild voorkomende zwarte populier *P. nigra*.

B3. Overlevingsvermogen

B3a) vermogen om overlevings- of ruststadia te vormen;

Populier is een overblijvende houtvormende plantensoort, die zaden vormt. Deze zaden zitten in een katoenpluis die met de wind over een behoorlijke afstand kan worden verspreid. De grauwe abeel staat bekend om het feit dat zijn wortelstekken weer uit kunnen schieten en een nieuwe boom vormen.

B3b) mogelijke specifieke factoren die op het overlevingsvermogen van invloed zijn.

-

B4. Verspreiding

B4a) wijzen en mate (b.v. een raming van de afname van levensvatbare pollen en/of zaad met de afstand) van verspreiding:

Pollen

Aangezien gewerkt wordt met een vrouwelijke kloon wordt er geen transgeen pollen geproduceerd. De verspreiding over langere afstanden kan dan ook enkel plaatshebben via zaad. In dit geval worden de bomen echter in zogenoemde korte-omloop geteeld wat betekent dat de takken op de bomen nooit ouder dan 3 jaar worden. Korte-omloop betekent het planten van de boom en het in de winter na het eerste groeiseizoen kort boven de grond afknippen van de boom waarna deze als een soort struik uitspruit. Deze nieuwe takken worden dan na drie jaar opnieuw afgeknipt aan de grond. Grauwe abeel maakt normaal pas na 5 tot 8 jaar voor de eerste keer bloemen aan, wat de kans klein maakt dat in de veldproef bloemen zullen verschijnen. Mochten er toch bloemen verschijnen dan zullen dat zoals gezegd vrouwelijke bloemen zijn die geen pollen kunnen produceren en verspreiden.

Zaden

Zaad van de grauwe abeel verliest snel zijn levensvatbaarheid (na 2 tot 4 weken). De vestiging van populier vanuit verspreide zaden is zeldzaam omdat aan de ecologische condities noodzakelijk voor het ontkiemen van de zaden en de ontwikkeling van de zaailing zelden tegelijkertijd voldaan worden: naakt terrein, afwezigheid van concurrentie, voldoende licht, voldoende, maar niet teveel vocht (Bouvarel et Lemoine 1957).

Het is alom bekend dat zaden van populieren slechts gedurende korte tijd hun kiemkracht behouden als zij blootgesteld worden aan kamertemperatuur en normale luchtvochtigheid (Stettler et al, 1996). Zaden van populier moeten snel na hun verspreiding kale, vruchtbare grond bereiken, omdat ze anders al niet meer voldoende kiemkrachtig zijn om succesvol wortel te kunnen schieten. Zaden van het genus *Populus* bezitten geen echte dormantie en dat is de reden dat deze populieren geen zaadbanken vormen.

Onder natuurlijke omstandigheden is vochtigheid de belangrijkste factor die de leefbaarheid van de zaden beïnvloedt en die er samen met temperatuursinvloeden voor zorgt dat de kiemkracht in veel minder dan 1 seizoen verloren gaat. Populieveredelaars moeten de zaden snel uit de katoenbol verwijderen om kiemkrachtige zaden te hebben. Experimenten hebben aangetoond dat het mogelijk is de kiemkracht gedurende langere tijd te behouden – één tot meerdere jaren – wanneer extreem droge condities (ten hoogste 10% luchtvochtigheid) en koude temperaturen (beneden het vriespunt) worden toegepast (Moss E.H., 1938). Dergelijke kunstmatige omstandigheden zullen tijdens de voorziene proef niet voor kunnen komen.

Wortelstekken

Grauwe abeel staat bekend om het feit dat hij gemakkelijk wortelstekken vormt uit oppervlakkig liggende wortelen. De veldproeven B/BE/07/V2 en B/BE13/V1 in respectievelijk Zwijnaarde en Wetteren hebben dit bevestigd.

Afgewaaide takken

Het is bekend dat de takken van een aantal populierensoorten relatief gemakkelijk wortel schieten. Afgewaaide takken kunnen eventueel wortel schieten op de plaats waar ze neerkomen na van de boom te zijn afgewaaaid, of ze kunnen verder verspreid worden door bijvoorbeeld vogels die ze meenemen om een nest te bouwen. Het feit dat veel populierensoorten gemakkelijk wortel schieten ligt aan de basis van de praktijk van vegetatieve vermeerdering via stekken van gerijpt hout. Afgewaaide takken vormen echter niet zomaar een nieuwe boom. Om succesvol wortel te schieten en zich succesvol te vestigen moet aan de volgende condities voldaan worden:

- Naakte grond
- Weinig of geen concurrentie van andere planten
- Voldoende water, maar niet teveel
- Voldoende zonlicht, maar niet overmatig.

Dergelijke condities komen in de praktijk wel voor, maar zijn een uitzondering. Het staat bovendien vast dat de vegetatieve vermeerdering via stekken bij bepaalde soorten uit de *Leuce* sectie, waaronder *P.x canescens* (grauwe abeel, zoals toegepast in de vooropgestelde proef) moeilijk is (FAO, 1979). De *P. x canescens* kloon 717-1-B4 blijft enkel onder kunstmatig gecreëerde optimale (laboratorium)condities, met toevoeging van stekpoeder (groeihormoon), wortel te schieten.

B4b) mogelijke specifieke factoren die van invloed zijn op de verspreiding.

Er zijn twee factoren van invloed op de verspreiding: (1) wind, en (2) oppervlakkige wortelgroei.

Een combinatie van warmte en wind op het moment van loslaten van de zaden kan tot gevolg hebben dat de zaden over een behoorlijke afstand worden verspreid (tot enkele kilometers). De zaden zijn heel klein en bevinden zich in een katoenbol.

Oppervlakkige wortelgroei kan aanleiding geven tot het ontstaan van uitlopers.

B5. Geografische verspreiding van de plant

Populieren in het algemeen, komen voor op het noordelijk halfrond, in Noord-Amerika, Europa en Azië (FAO, 1979). Ze komen er in het wild voor en ze worden er doelbewust aangeplant. In de Benelux zijn de ratelpopulier (*Populus tremula*) en de zwarte populier (*Populus nigra*) inheems. De laatste komt zeer weinig meer voor. Ook de grootschalige introductie van euramerikaanse populieren heeft de genetische integriteit van de wilde zwarte populier aangetast. Wilde populieren komen in Europa van oudsher voor op lage vochtige gronden zoals rivieroeveren. Gekweekte populieren komen zeer veel voor. In veel gevallen gaat het dan om de euramerikaanse populier *P. x canadensis* of om interamerikaanse hybriden. Op de tweede plaats komt de grauwe abeel (*P. x canescens*). Daarnaast zijn er ook *P. alba*, *P. simonii*, *P. trichocarpa* en hybriden van verschillende Amerikaanse populieren. Populieren zijn aangeplant in bosverband, maar ook veel in rijbeplanting langs wegen, kanalen en dijken, als erfafscheiding, en als sierboom.

De geografische verspreiding van de populieren waarmee de grauwe abeel succesvol kan uitkruisen is, zoals ook al onder B2b aangegeven:

P.x canescens komt met name voor in West-, Midden- en Zuid-Europa, met uitlopers naar Noord-Afrika en West-Azië (FAO, 1979).

P.alba, de witte abeel, komt voor in midden en Zuid-Europa, maar ook in het midden en westen van Azië. Ook in de Benelux komt hij voor en is hij veel aangeplant in parken en

tuinen als sierboom. *P.tremula*, de ratelpopulier of esp (aspen in het Engels), komt voor in Europa, Noord-Afrika en Azië (OECD, 2001).
P.tremuloides, de 'quaken aspen', komt voor in Noord-Amerika, met name in de middelste en noordelijke staten van de VS en de Rocky Mountains, en over heel Canada. In Europa komt de boom ook voor in aangeplante vorm.

B6. Voor plantensoorten die normaal niet in de lid-Staten voorkomen een beschrijving van de natuurlijke habitat, waaronder informatie over natuurlijke predatoren, parasieten, concurrenten en symbionten.

Niet van toepassing

B7. Andere eventuele interacties die voor het GGO van belang zijn, van de plant met organismen in het ecosysteem waar hij gewoonlijk wordt geteeld, of elders, waaronder informatie over de toxische effecten op mensen, dieren en andere organismen.

De grauwe abeel kan in interactie staan met blad- of houtetende insecten (Delplanque, 1998). Er zijn ook interacties met pathogene organismen, met name schimmels die roestziekten veroorzaken (Laurans et Pilate, 1999) en met niet pathogene mycorrhizae vormende wortelschimmels.

Interacties met insecten

Populieren leven samen met een brede waaier aan insecten. De meeste insecten vormen echter alleen in artificiële aanplantingen van populier een serieuze bedreiging (OECD, 2001). In Noord-Amerika is *Chrysomela scripta* het meest schadelijke bladete insect. In het algemeen zijn hybride aanplantingen centra van insectaanwezigheid. Op *P.x canescens* (grauwe abeel) is de wilgenhoutrups (*Cossus cossus*) een gekend insect (Forest Ecology and Forest Management Group, Wageningen UR: Tree fact sheet, *Populus x canescens*). De schade die aangericht wordt door bladete insecten blijkt sterk variabel en hangt onder meer af van de locatie, de gebruikte kloon, de soort en de gebruikte vaderlijnen (Tomescu et al, 2007).

Interacties met schimmels

De schimmels die geassocieerd zijn met populieren zijn ongelofelijk divers. Alleen al bij de afbraak van *P.tremuloides* kunnen meer dan 250 schimmelsoorten betrokken zijn. Schimmels zijn niet alleen betrokken bij de afbraak, maar schimmels kunnen ook op andere manieren geassocieerd zijn met populieren, met name als symbiotische mycorrhizae, en als ziekteveroorzakende schimmels. De op *P.x canescens* (grauwe abeel) meest voorkomende schimmelziekten zijn bladvlekkenziekte (*Pollacia radiosa*) en roest (*Marssonina larici-populina*) (Forest Ecology and Forest Management Group, Wageningen UR: Tree fact sheet, *Populus x canescens*).

Populieren kennen symbiotische mycorrhizae. Er zijn aanwijzingen dat de aanwezigheid van deze schimmels de watertransportcapaciteit bevorderen in omstandigheden van droogte (Zaklina Marjanovi et al, 2005).

Interacties met bacteriën

Er zijn een aantal bacterieziekten die op populier voorkomen. In de sectie *Populus* is die vooral *Hypoxyylon mammatum*. Op *P.x canescens* komt ook *Xanthomonas populi* voor. Beiden veroorzaken vormen van bacteriekanker (OECD, 2001 en Forest Ecology and Forest Management Group, Wageningen UR: Tree fact sheet, *Populus x canescens*).

Interacties met herbivoren

Er zijn heel wat zoogdieren die zich voeden met de (jonge) bast, wortels en met bladeren van de populier. Het gaat bijvoorbeeld om herten, elanden en rendieren, maar ook hazen en konijnen. Er is een grote variatie in de voedingspreferenties voor bepaalde hybriden en klonen. Vermoed wordt dat dit wordt veroorzaakt door de variatie in de concentratie van

fenolische glycosiden waarvan bekend is dat zij een rol spelen in de verdediging tegen vraat door zoogdieren (OECD, 2001)

Toxische effecten op de mens

De mens komt op verschillende manieren in contact met de populier. Ten eerste door bomen manueel te manipuleren, bijvoorbeeld bij het planten, snoeien, en het zagen en verwerken van het hout. Daarnaast komt de mens in aanraking met pollen en zaden van de populier. Er zijn geen schadelijke effecten bekend van het manueel manipuleren van hout. Wel zijn er limieten aan de hoeveelheid houtstof die men mag inademen en als gevolg daarvoor gelden er regels voor de afzuiging van houtstof in houtzagerijen.

Het is bekend dat pollen van populieren allergieën kunnen veroorzaken (zie oa. www.pollenlibrary.com en www.pollenplus.com). Pollen van populier staat bekend als een gematigd allergeen. De gebruikte 717-1-B4 kloon is echter een vrouwelijke kloon die geen pollen produceert en om die reden ook geen pollengeassocieerde allergie kan veroorzaken.

C. INFORMATIE OVER DE GENETISCHE MODIFICATIE

Een gedetailleerde beschrijving van de genetische modificatie is weergegeven in bijlage 2.

C1. Beschrijving van de voor de modificatie toegepaste methoden

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

C2. Aard en herkomst van de gebruikte vector

De gebruikte pK7GWIWG2II-CSE vector is een zogenoemde 'gateway' afgeleide vector. Het gateway systeem is ontwikkeld om in verschillende systemen op een eenvoudige en efficiënte manier aan 'recombinatorial cloning' te kunnen doen. Vergelijkbare systemen zijn ook specifiek ontwikkeld voor de toepassing in planten. Deze systemen zijn gebaseerd op Cre-*lox* (Vergunst et al. 2000), FLP-*FRT* (Li et al. 2010), R-RS (Nanto et al. 2005), phiC31-*att* (Lutz et al. 2004) and Bxb1-*att* (Yau et al. 2011). Ze zijn gemaakt om op een eenvoudige manier extra modificaties toe te voegen aan planten die al een modificatie hebben, en om op een eenvoudige manier bepaalde genen weer uit de planten te kunnen verwijderen (Ow, 2011). In geen van de gevallen wordt genetische instabiliteit van de geïntroduceerde traits gerapporteerd. Excisie geschiedt enkel in doelbewust gecreëerde omstandigheden.

C3. Omvang en aard (naam) van het (de) donororganisme(n) en bedoelde functie van ieder onderdeel van de sequentie die zal worden ingebouwd

Zie bijlage 2.

Overzicht van de transgene lijnen in de veldproef

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

D. INFORMATIE OVER DE GENETISCH GEMODIFICEERDE PLANT

D1. Beschrijving van de eigenschappen die zijn geïntroduceerd of gewijzigd

De twee lijnen bevatten elk het *npt-II*-gen dat resistentie verleent tegen de antibiotica kanamycine en neomycine en het cm^R (*cat*) gen dat resistentie verleent tegen het antibioticum chloramphenicol. Het *npt-II*-gen produceert in de plant het enzym neomycine phosphotransferase. Dit enzym fosforileert de antibiotica kanamycine en neomycine waardoor ze hun werking verliezen. Het *cat*-gen codeert voor het enzym chloramphenicol acetyl transferase dat het antibioticum chloramphenicol acetyleert en daarmee uitschakelt. Het staat in de plant echter onder controle van zijn natuurlijke bacteriële regulatiesquenties en komt om die reden niet tot expressie in de plant.

De twee lijnen bevatten daarnaast ook een genetisch construct bestaande uit een deel van het Caffeoyle Shikimate Esterase (CSE) gen in sense-oriëntatie en deel van het CSE gen in antisense-oriëntatie dat complementair is aan het deel in sense-oriëntatie, gescheiden door een intron waarin het cm^R zich bevindt. De expressie van deze sequentie leidt tot de productie van messenger RNA (mRNA) moleculen die een hairpin-vorm hebben. Het cm^R mRNA wordt tijdens de vorming van de hairpin molecule verwijderd en vervolgens afgebroken. Het vormt geen onderdeel van de hairpin. Deze hairpin mRNA moleculen zetten de plant aan om native CSE mRNA moleculen af te breken. Als gevolg daarvan wordt er veel minder van het CSE enzym aangemaakt. Dit proces wordt RNA-interferentie genoemd, RNAi afgekort (Baulcombe, 2004).

CSE is betrokken in biosynthese van de monolignolen die de basis vormen van lignine. Monolignolen zijn de elementaire eenheden waaruit de ligninepolymeer is opgebouwd (zie bijlage 3 voor het deel van de monolignol biosynthese pathway waar CSE bij betrokken is). Lignine is een van de hoofdbestanddelen van de celwand (en dus van hout), naast cellulose en hemicellulose. Het effect van de verminderde hoeveelheid CSE enzym is dat de hoeveelheid lignine is afgenomen (19% minder in hpCSE#1 en 25% minder in hpCSE#2), en het aandeel cellulose is toegenomen (8% meer in hpCSE#1 en 13% meer in hpCSE#2) (Saleme, 2017).

Als laatste bevatten de planten ook de *attB1* en *attB2* sequenties, die afgeleid zijn van de *attB* sequenties afkomstig van faag lambda. Dit zijn recombinatiesites die in de gebruikte vector aanwezig zijn om eenvoudige 'recombinatorial cloning' mogelijk te maken bij het vervaardigen van de transformatievector.

D2. Informatie over de sequenties die zijn geïntroduceerd/geëlimineerd :

D2a) omvang en structuur van het donormateriaal en de methoden die zijn gebruikt voor de karakterisering daarvan, waaronder informatie over alle delen van de in de planten geïntroduceerde vector of over eventuele dragers van vreemd DNA dat in de planten achterblijft;

Zie bijlage 2.

D2b) bij een eliminatie, omvang en functie van de geëlimineerde sequentie(s);

Niet van toepassing.

D2c) aantal kopieën van het donormateriaal;

N° van de event	Aantal kopieën
hpCSE#1	3 (verdeeld over 2 loci)
hpCSE#2	1

Zie ook bijlage 2.

D2d) plaatsen van het donormateriaal in de plantencellen (geïntegreerd in een chromosoom, in chloroplasten of mitochondriën of achterblijvend in niet-geïntegreerde vorm) en methoden voor de bepaling daarvan.

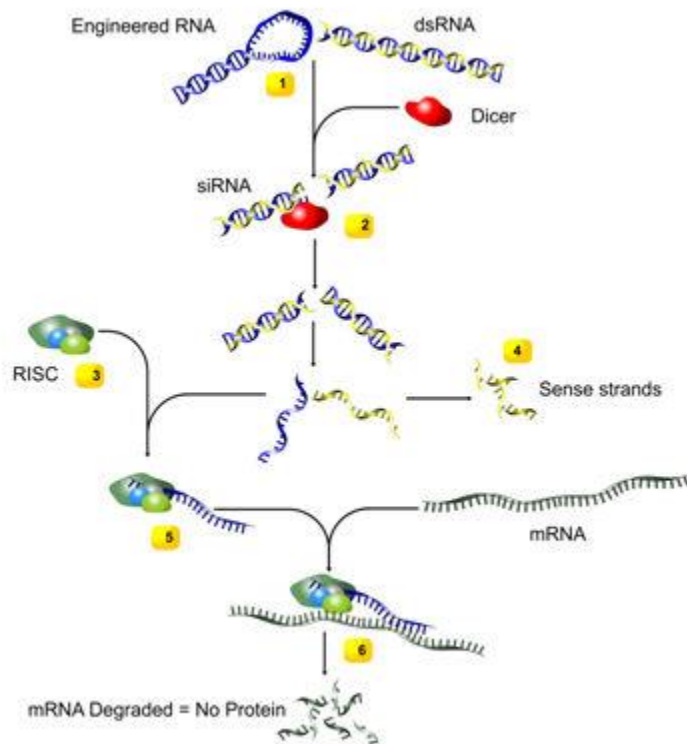
In beide gevallen is het donormateriaal geïntegreerd in het nucleair genoom van de plant in een chromosoom.

D3. Informatie over de expressie van het donormateriaal

D3a) informatie over de ontwikkelingsexpressie van het donormateriaal tijdens de levenscyclus van de plant en over de methoden die voor de beschrijving daarvan worden toegepast;

De expressie van de hairpin messenger-RNAs staat onder controle van de 35S promoter. Meestal wordt aangegeven dat deze promoter tot constitutieve expressie leidt. Het is gekend dat deze promoter, eenmaal een bepaald stadium in de embryogenese voorbij, leidt tot expressie in de meeste cel- en weefseltypes, al varieert de mate van expressie per celtype (Sunilkumar *et al*, 2002). Er is geen weefsel specifieke expressie. De expressie van de hairpin mRNAs leidt niet tot de productie van eiwitten. De hairpins leiden tot posttranscriptionele modificatie van de expressie van native CSE-gen via het mechanisme van RNAi (zie oa Baulcombe 2004). De RNAi leidt tot afbraak van de native CSE mRNA moleculen (zie de afbeelding hieronder). Minder messenger betekent minder CSE-enzym. En minder CSE-enzym leidt tot de ophoping van coniferaldehyde en synapaldehyde (zie ook bijlage 3). Deze moleculen worden vervolgens ook naar de celwand getransporteerd en worden daar in de ligninepolymeren ingebouwd.

Er is nagegaan hoeveel CSE messenger RNA er in de transgene planten nog aanwezig is. Wildtype populier bevat twee homologe CSE-genen: PtxaCSE1 en PtxaCSE2. In de hpCSE#1 planten is de hoeveelheid PtxaCSE1 messenger gereduceerd tot ongeveer 50% en van PtxaCSE2 tot een kleine 20% van de hoeveelheid messenger aanwezig in wildtype planten. In de hpCSE#2 planten is de hoeveelheid PtxaCSE1 messenger gereduceerd tot een kleine 40% en van PtxaCSE2 tot rond de 15% van de hoeveelheid messenger aanwezig in wildtype planten (Saleme, 2017, fig 3a).



Figuur: de manier waarop een hairpin RNA-molecuul leidt tot de afbraak van messenger-RNA.

(voor een animatie over hoe RNA-interferentie werkt, zie:
<http://www.nature.com/nrg/multimedia/rnai/animation/index.html>)

Lignine speelt een belangrijke rol in de groei en ontwikkeling van bomen, met name in watergeleiding, mechanische ondersteuning, maar ook in de plantenafweer. Eerdere proeven hebben aangetoond dat er een balans gevonden moet worden tussen aan de ene kant een gewenste wijziging in lignine hoeveelheid en samenstelling, en aan de andere kant een beperking van de mogelijke negatieve effecten op de groei en ontwikkeling.

Zoals in de figuur in bijlage 2 ook weergegeven staat, bevat de transformatievector in de sequentie die codeert voor het hairpin construct ook het cm^R gen. Dit cm^R gen is in deze sequentie gelegen tussen twee introns. Dit gen staat onder controle van zijn originele bacteriële regulatiesignalen en komt om die reden niet tot expressie in de plant. Bovendien is het zo dat de cm^R sequentie als gevolg van splicing uit het gevormde messenger construct wordt verwijderd en dus niet aanwezig is in de finaal gevormde hairpin RNA molecule.

D3b) delen van de plant waar het donormateriaal tot expressie wordt gebracht (b.v. wortels, stam, pollen enz.).

De expressie van het gen verantwoordelijk voor de downregulatie staat onder controle van een 35S promotor. Meestal wordt aangegeven dat deze promotor tot constitutieve expressie leidt. Het is gekend dat deze promotor, eenmaal een bepaald stadium in de embryogenese voorbij, leidt tot expressie in de meeste cel- en weefseltypes, al varieert

de mate van expressie per celtype (Sunilkumar *et al*, 2002). Er is geen weefsel-specifieke expressie.

Het *npt-II* gen staat onder de controle van een NOS promotor. Er is heel wat informatie beschikbaar over spatiële en temporele expressie van genen die aangestuurd worden door de NOS promotor. Een relevante referentie (Wei *et al*, 2006.) heeft de expressie van een P_{NOS} aangestuurd GUS gen in populier bestudeerd. P_{NOS} blijkt expressie te geven in zowel wortels, als in scheuten, stam en in blad. De hoogste expressie komt voor in wortels, de laagste in scheuten. Stam en blad zitten daar tussen in. Over het algemeen wordt de NOS promotor beschouwd het meest actief te zijn in de basale delen van de plant, waarbij zijn activiteit afneemt in de vegetatieve delen van de plant tijdens het begin van de bloei, terwijl de activiteit in de bloem zelf verhoogd is. In transgene tabak bleek de activiteit van de promotor verhoogd in calyx, corolla en meeldraden, hoewel de maximum promoteractiviteit in elk van de organen gradueel was en aangetroffen werd in verschillende stadia van de bloemontwikkeling. In de stamper was de promoteractiviteit laag en werd deze geleidelijk hoger in de eicellen na 'anthesis'. In ontwikkelende vruchten, werd de NOS promotor activiteit sterk geïnduceerd gedurende de middenstadia van de embryogenese. In transgene tabaksplanten is de expressie door de NOS promotor dus ontwikkelingsgereguleerd en orgaanspecifiek (Gynheung *et al*, 1988).

D4. Informatie over de verschillen tussen de genetisch gemodificeerde plant en de recipiënte plant

D4a) voortplantingswijze(n) en/of -snelheid;

Aangezien de CSE-gemodificeerde populieren alleen nog maar in serres zijn gegroeid is het niet mogelijk geweest om na te gaan of er verschillen zijn met conventionele bomen voor wat betreft de voortplantingswijze en/of snelheid.

Uit eerdere proeven met transgene populieren die vergelijkbare wijzigingen in de houtsamenstelling hadden, zijn in de meeste gevallen geen verschillen gevonden met conventionele populieren voor wat betreft de voortplantingswijze en/of snelheid van voortplanting. Eerdere veldproeven met lignine-gemodificeerde populieren zijn uitgevoerd in Engeland, Frankrijk en België en kennen de dossiernummers B/GB/95/R1/4, B/GB/96/R1/6, B/FR/99/02/15, B/FR/07.06.01, B/BE/07/V2 en B/BE/13/V1. Enkel in veldproef B/BE/13/V1 is een vervroegde bloei op de transgene lijnen waargenomen waarbij er bloeiwijzen op drie jaar oude takken verschenen, terwijl op de wildtype bomen op dat moment geen bloeiwijzen verschenen. In deze veldproef was het CAD enzym middels RNAi neergeregeld.

D4b) verspreiding;

Aangezien CSE-gemodificeerde populieren alleen nog maar in serres zijn gegroeid en nog nooit het bloeistadium hebben bereikt is het niet mogelijk geweest om na te gaan of er verschillen zijn met conventionele bomen in de verspreiding via pollen en/of zaden.

D4c) vermogen om te overleven.

Aangezien CSE-gemodificeerde populieren alleen nog maar in serres zijn gegroeid is het niet mogelijk geweest om na te gaan of er verschillen zijn met conventionele bomen in het vermogen van de bomen om in de natuur te overleven.

Onder serre-omstandigheden hebben de CSE-gemodificeerde bomen een groeisnelheid die vergelijkbaar is met die van wildtype bomen.

D5. Genetische stabiliteit van het donormateriaal en fenotypische stabiliteit van GGHP's

De genetische stabiliteit van het donormateriaal is niet direct getest.

De vraag kan gesteld worden of de *attB1*, en -2 sequenties eventueel bijdragen tot een hogere instabiliteit van de genetische modificatie. Dit is niet direct getest. Dit soort van vectoren wordt in het plantenonderzoek op grote schaal gebruikt. Er zijn al heel grote hoeveelheden planten getransformeerd met behulp van dit type vectoren, waarbij met name in *Arabidopsis thaliana* al meerdere generaties zijn bestudeerd. Voor zover ons bekend zijn hierbij nog geen problemen opgedoken in de vorm van genetische instabiliteit van het donormateriaal.

D6. Wijziging in het vermogen van de GGHP's om genetisch materiaal op andere organismen over te dragen

Het is niet bekend of er een wijziging is opgetreden in het vermogen om genetisch materiaal over te dragen. Door het moeten plukken van bloemen is het niet mogelijk geweest om dit te testen.

Opgemerkt wordt dat in deze veldproef voorkomen wordt dat de planten bloeien, en dat worteluitlopers vernietigd worden, zodat de overdracht van genetisch materiaal naar andere populieren niet mogelijk is.

De planten bevatten zoals onder D1 al vermeld ook de *attB1* en *attB2* sequenties die afgeleid zijn van DNA sequenties die faag lambda gebruikt bij het integreren van zijn genoom in dat van de *E.coli* bacterie. De *attB1* en *attB2* sequenties kunnen recombineren met respectievelijk de *attP1* en *attP2* sequenties in aanwezigheid van gelijke hoeveelheden van de faag lambda eiwitten Int en Xis (Katzen, 2007; Hartley, 2000). Dit zijn de eiwitten van het 'integrase-excisionase complex'. De vraag die zich hier stelt is of die sequenties op zich enig risico kunnen opleveren en of de aanwezigheid van de *attB1* en *attB2* sequenties de kans op horizontale genoverdracht vanuit de gemodificeerde plant naar micro-organismen vergroot, en zo ja, of dat zou kunnen leiden tot ongewenste milieueffecten. Om succesvolle recombinatie te bewerkstelligen tussen het planten-DNA en bacterieel DNA moet het planten-DNA in een micro-omgeving terecht komen waarin:

- a. de voor recombinatie benodigde eiwitten Int en Xis in gelijke hoeveelheden aanwezig zijn, en
- b. een DNA-molecule aanwezig is die de volgende att-sequenties bevat: *attP1* en *attP2*.

De lambda eiwitten Int en Xis komen in gelijke hoeveelheden voor in door faag lambda geïnfecteerde *E.coli* (lysogene *E.coli*) waarin de faag lambda een infectiecyclus is gestart. Het is op dat moment dat het faag genoom afgelezen wordt en dat deze twee eiwitten geproduceerd gaan worden. Een lysogene cyclus wordt bij hoge uitzondering uitgevoerd, in ongeveer 1 op de 10.000 bacteriële delingen. *E.coli* en faag lambda komen in het milieu veelvuldig voor. *E.coli* is een bacterie die algemeen voorkomt in het darmstelsel van de mens en andere dieren. De verspreiding naar het leefmilieu geschiedt vooral via uitwerpselen. Daar waar uitwerpselen en mest in het milieu voorkomen, komt *E.coli* in verhoogde concentraties voor.

Op grond van de huidig beschikbare kennis is het niet voorstelbaar dat er buiten een bacteriële cel of buiten een cel waarin genen die coderen voor Int en Xis tot expressie worden gebracht, een micro-omgeving kan ontstaan waarin een integrase-excisionase complex actief kan zijn. Met andere woorden; om horizontale genoverdracht mogelijk te maken moet het transgeen DNA met de *att* sequenties eerst door een ander mechanisme door een bacterie worden opgenomen in stukken die groot genoeg zijn om een intact transgen overgedragen te krijgen. Soortvreemd-DNA wordt over het algemeen in een bacterie echter snel afgebroken door restrictie-enzymen. Opname van planten-DNA door bacteriën geschied niet in intacte plantencellen of weefsels. Planten-DNA komt

pas vrij als de plant afgebroken wordt, bijvoorbeeld door compostering. Ook wanneer dit DNA zou worden opgenomen door een *E.coli* bacterie zal de kans op verspreiding van het transgeen DNA niet verhogen aangezien de *attB1* en *-B2* sequenties enkel een excisie-integratie-plaats vormen voor faag lambda.

Niet alleen faag lambda heeft het vermogen om in *E.coli* te integreren via een integrase-excisionase complex (Int-Xis). Heel wat van de 'temperate bacteriophages' (de fagen die hun erfelijk materiaal in het genoom van de bacterie insereren waardoor de bacterie 'lysogeen' wordt), maken gebruik van een Int-Xis complex (Piazolla et al, 2006). Naast faag lambda maken bijvoorbeeld ook de fagen P2, P4 en ϕ 24B gebruik van hetzelfde systeem (Piazolla et al, 2006; Fog et al, 2010).

Het is niet bekend of er in de natuur, in een micro-omgeving waarin Int en Xis voorkomen, DNA-moleculen voor kunnen komen die *attP1* en *attP2* sequenties bevatten. Feit is dat de *attP1* en *attP2* sequenties qua DNA-volgorde doelbewust afwijken van de AttP sequenties die oorspronkelijk uit faag lambda geïsoleerd zijn geweest, en die aan de basis liggen van de ontwikkeling van het Gateway vector systeem. Deze verschillende Att sequenties zijn gemaakt om de directionaliteit van de te cloneren genen te kunnen bewaren (Katzen, 2007; Hartley, 2000). De *attP1* en *attP2* sequenties zijn van *attP* afgeleid door er mutaties in aan te brengen. *AttB1* recombineert met *attP1* en *attB2* recombineert met *attP2*, of toch op zijn minst met een zeer grote voorkeur. De kans dat de *attB1* en *attB2* sequenties recombineren met de natuurlijke AttP sequentie is klein (Ow, 2007).

Als de kans op horizontale genoverdracht niet nul is, dan is uiteindelijk de vraag of zulk een eventuele overdracht naar een bacterie (*E.coli*) enig ongewenst effect zou kunnen sorteren. De cruciale vraag is dan of twee partiële CSE-sequenties en/of een CSE-intron voor *E.coli* een selectief voordeel zouden kunnen opleveren en of de sequenties zich in *E.coli* zouden kunnen handhaven. Het antwoord hierop is naar onze inschatting een duidelijk neen.

Samengevat komt onze analyse op het volgende neer:

- de kans op activiteit van een integrase-excisionase complex buiten een bacteriële cel is bijzonder klein.
- de kans op opname van planten-DNA dat voldoende intact is, in een bacterie is bijzonder klein;
- de kans op aanwezigheid van 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 is bijzonder klein;
- De kans op succesvolle genoverdracht wordt verkleind door het feit dat de *attB1* en *-B2* sequenties gemuteerd zijn ten opzichte van de wildtype *attB* sequenties waarvan ze ooit afgeleid zijn;
- Als er al horizontale genoverdracht zou zijn, dan geeft het CSE gen geen selectief voordeel, waardoor de kans bijzonder klein is dat het er zich zou handhaven.

D7. Informatie over toxische, allergene en andere schadelijke effecten op de gezondheid van de mens, als gevolg van de genetische modificatie

De modificatie is uitgevoerd met soorteigen genen die een gewijzigde houtsamenstelling tot gevolg hebben. De hoeveelheid lignine is verlaagd en het percentage cellulose in het hout is toegenomen.

De mens komt op verschillende manieren in aanraking met hout. Bijvoorbeeld door het manueel te manipuleren of door contact met of het inademen van houtstof. Hout

consumeren doen we niet. Hout wordt verwerkt tot allerlei producten. Populier wordt met name gebruikt voor de papierproductie. Er zijn geen redenen om te veronderstellen dat een gewijzigde houtsamenstelling een toxisch, allergeen of ander schadelijk effect zou hebben op de menselijke gezondheid. De modificatie is in zijn directe effect vergelijkbaar met een natuurlijke mutatie die ofwel het CSE enzym in zijn actief centrum zou treffen waardoor het minder actief wordt, ofwel tot gevolg zou hebben dat het CSE enzym veel minder tot expressie komt. Er zijn in de natuur bomen bekend waarin mutaties aanwezig zijn in de genen betrokken in de biosynthese van lignine, met een wijziging van de houtsamenstelling tot gevolg. Zo is er een natuurlijke mutatie aangetroffen in het gen dat codeert voor het CAD enzym in een bepaalde dennensoort (*Pinus taeda*) (Gill et al, 2003). Deze mutant komt van nature voor in de Verenigde Staten en er zijn geen aanwijzingen dat deze mutant in vergelijking met niet-mutante dennen meer toxisch of allergeen zou zijn. Ook in populier komen er in de natuur bomen voor die mutaties dragen in genen die coderen voor enzymen die betrokken zijn in de lignine-biosynthese, met wijziging van de ligninesamenstelling tot gevolg. Zo is recent mbv 'pooled multiplexed next generation sequencing' in *Populus nigra* de HCT1-Δ73 mutant geïdentificeerd (Marroni et al, 2011). HCT1 is één van de enzymen betrokken in de ligninebiosynthese en de Δ73-mutant heeft een vervroegd stopcodon, waardoor het enzym de laatste 73 aminozuren mist. De *P.nigra* lijn 71030-501 is homozygoot voor de HCT1-Δ73 mutatie en deze populier heeft als gevolg daarvan een gewijzigde houtsamenstelling. De hoeveelheid lignine in deze populieren is niet gewijzigd, maar er heeft een accumulatie plaats van zogenoemde H-bevattende oligolignolen en het lignine heeft als gevolg daarvan een grotere S/G ratio (Vanholme B., et al, 2013). Hoe groter de S/G ratio, hoe gemakkelijker de lignine zich laat afbreken. Er is geen enkele aanwijzing dat het gewijzigde hout van deze zwarte populier op een of andere wijze schadelijk zou zijn.

Het is natuurlijk niet volledig uit te sluiten dat als gevolg van insertie van het donormateriaal op een ongunstige locatie in het genoom van de plant, 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 abberante, ongewenste eigenschappen zijn geëlimineerd. Daarnaast hebben eerder uitgevoerde veldproeven met deze lijnen in Frankrijk geen onverwachte, ongewenste eigenschappen aan het licht gebracht.

Ook in deze proef zal het hout manueel gemanipuleerd worden. Er zal echter geen of nauwelijks houtstof worden gemaakt, wel zaagsel. En de takken zullen verhakseld worden. Ook hierbij zal geen houtstof worden gemaakt. Manipulatie van dit type transgene bomen en het ervan afkomstige hout, over de jaren heen in laboratoria, serres en veldproeven heeft nog nooit een schadelijk effect veroorzaakt bij de mensen die met het materiaal werken. Er is dan ook geen enkele reden te veronderstellen dat dit nu wel het geval zou zijn.

Pollen van populier zijn gekend als een gematigd allergeen. Aangezien de modificatie aangebracht is in de vrouwelijke kloon 717-1-B4 die geen pollen kan produceren, is er geen effect van de modificatie mogelijk op het allergisch potentieel via pollen.

Aanwezigheid van npt-II en cm^R antibioticumresistentiegenen

In de bomen zijn ook de *npt-II*- en *cm^R*-genen aanwezig. Het *npt-II* gen codeert voor het enzym neomycine fosfotransferase dat resistentie verleent tegen de antibiotica kanamycine en neomycine. Dit gen is als merker toegevoegd voor het kunnen selecteren van planten die de modificatie hebben opgenomen. De Europese Autoriteit voor Voedselveiligheid (EFSA) heeft geoordeeld dat het gebruik van dit gen als merker in genetisch gemodificeerde planten onschadelijk is (EFSA, 2004, en EFSA, 2009).

De aanwezigheid van het *cm^R*-gen laat toe om constructen na recombinatie te kunnen selecteren op chloramphenicol-bevattend LB medium. Het gen bevat zijn natuurlijke bacteriële expressiesignalen en komt om die reden niet in de planten tot expressie. Volgens EFSA behoort het *cm^R*-gen tot de groep van antibioticumresistentiegenen wiens aanwezigheid in genetisch gemodificeerde planten niet zal bijdragen tot hun aanwezigheid in bacteriën. Chloramphenicol-resistente bacteriën komen in de natuur zeer wijdverspreid voor en in veel gevallen dragen deze bacteriën het *cm^R*-gen (EFSA, 2004). Het feit dat het *cm^R*-gen in de natuur op een transposon voorkomt draagt bij aan de mobiliteit en verspreiding van dit gen in de natuur.

De EFSA opinie uit 2009 is de belangrijkste referentie waarop de risico-analyse van het gebruik van NPT-II in planten gebaseerd kan worden. Het rapport is gebaseerd op één van de meest brede, zoniet de breedste analyse van de relevante wetenschappelijke literatuur (ongeveer 240 literatuur referenties). In de tekst hieronder zullen we geen specifieke literatuurreferenties vermelden, maar bouwen we een evaluatie op, gebaseerd op de informatie beschikbaar in de geconsolideerde EFSA opinie:

In de risicoanalyse voor het gebruik van antibioticumresistentiegenen in genetisch gewijzigde planten, zijn de volgende vragen van crucial belang:

1. Verleent het gen resistentie tegen een antibioticum dat nog steeds van belang is voor de humane of veterinaire geneeskunde?
2. Hoe groot is de kans dat het resistentiegen door een bacterie opgepikt wordt uit een plant door middel van horizontale genoverdracht, en resulteert in een resistentie die functioneel is in die bacterie?
3. Hoe verhoudt de kans dat een bacterie de resistentie oppikt uit een plant zich tot de mogelijkheden voor de bacterie om de resistentie op te pikken uit de natuurlijke genenpool aanwezig in het leefmilieu?

Ad.1.

Het *npt-II* gen verleent resistentie tegen de antibiotic kanamycine en neomycine. Deze twee antibiotica hebben nog altijd klinische relevantie, al is hun systemisch gebruik beperkt: *“kanamycin is used as a second-line antimicrobial agent for the treatment of multiple drug-resistant tuberculosis. Neomycin is used for preoperative preparation of the bowel as adjunctive therapy as part of a regimen for the suppression of the normal bacterial flora of the bowel”* (EFSA consolidated opinion). Volgens Prof.Dr. Herman Goossens (University of Antwerp en internationaal erkend expert in het domein van antibioticumresistente bacteriën) is neomycine klinisch nauwelijks meer van belang, maar kan het nog aanwezig zijn in sommige oog- of oordruppels (persoonlijke communicatie Prof.Dr. Herman Goossens).

Het *cm^R*-gen verleent resistentie tegen het antibioticum chloramphenicol. In de EU wordt chloramphenicol zelden voor medische doeleinden gebruikt vanwege het risico op het veroorzaken van aplastisch anaemie en het antibioticum is niet toegelaten voor gebruik in dieren die gebruikt worden voor voedselproductie (EFSA, 2004).

Ad.2.

Succesvolle horizontale genoverdracht van de *npt-II* en *cm^R*-genen wordt bijzonder onwaarschijnlijk geacht. Het *npt-II* gen zoals het aanwezig is in genetisch gewijzigde planten bezit niet zijn natuurlijke bacteriële expressiesignalen. In dit specifieke geval wordt de expressie gereguleerd door de NOS-promoter en de Octopine Synthase terminator. 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 het resistentiegen zoals het aanwezig is in de planten en DNA 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. Het is bijzonder onwaarschijnlijk dat non-homologe recombinatie leidt tot de vorming van een resistentiegen dat functioneel is in de ontvangende bacterie. De EFSA opinie bevestigt dit en zegt: “*The transfer of antibiotic resistance marker genes from GM plants to bacteria has not been shown to occur either in natural conditions or in the laboratory in the absence of sequence identity in the recipient bacterial cell. Sequence identity is necessary to allow homologous recombination between the transformed DNA in the plant and bacterial DNA*”.

Ad.3.

Het *npt-II* gen dat als selectiemerker in de gemodificeerde planten aanwezig is, vindt zijn oorsprong in het Tn5 transposon uit *Klebsiella pneumoniae*. Het *cmR*-gen vindt zijn oorsprong in het Tn9 transposon uit *Escherichia coli*.

Volgens EFSA hebben “*recent metagenomic analyses of total bacterial populations (including non-cultivable bacteria) demonstrated that resistance determinants of kanamycin, neomycin and streptomycin are present in all environments investigated. Such resistance genes may be selected from this environmental reservoir and disseminated among bacteria*”. De Tn5 en Tn9 transposons waarvan de resistentiegenen afkomstig zijn, zijn zeer mobiele genetische elementen.

Wanneer we de drie bovenstaande elementen integreren is de conclusie dat de bijzonder kleine kans op succesvolle horizontale genoverdracht, gecombineerd met de in het leefmilieu wijd verspreide aanwezigheid van natuurlijke resistentiedeterminanten tegen kanamycine, neomycine en chloramphenicol maakt dat de kansen dat een bacterie de resistentie oppikt uit de reeds aanwezige resistentiepool vele malen groter zijn dan de kansen dat de bacterie een functionele resistentie oppikt uit een genetisch gewijzigde plant. Deze inschatting wordt gedeeld door de overgrote meerderheid van de wetenschappelijke opinie, enkele uitzonderingen daargelaten (zie ook geconsolideerde EFSA opinie). De aanwezigheid van de *npt-II* en *cm^R* genen in planten vormt geen onaanvaardbaar risico, ook al hebben specifiek kanamycine en neomycine nog enige klinische relevantie. Bovendien gaat het hier om een zeer kleinschalige veldproef met een beperkt aantal bomen die de antibioticumgenen bevatten: 96 stuks.

Het *npt-II* gen is ook aanwezig in verschillende genetisch gewijzigde gewassen die op de Europese markt zijn toegelaten voor import en verwerking in humane en diervoeding, en in de Amflora aardappel die kortstondig in de EU geteeld is geweest. Deze Amflora-aardappelen zijn op enkele honderden hectaren verbouwd geweest, verspreid over Zweden, Duitsland en Tjechië. In België hebben al meerdere veldproeven plaatsgehad met planten waarin het *npt-II* gen aanwezig was (veldproeven B/BE/10/V1, B/BE/10/V2, B/BE/13/V1).

We erkennen dat er vandaag ook alternatieve selectiemerkers bestaan (bijv. herbicidetolerantie), waardoor het gebruik van antibioticumresistentiegenen als selectiemerker vermeden kan worden. In het wetenschappelijk onderzoek worden antibioticumresistentiemerkers vandaag echter nog altijd gebruikt vanwege hun enorme gebruiksgemak.

Afwezigheid van backbone sequenties

Er is aangetoond dat de transgene lijnen geen backbone sequenties bevatten (zie bijlage 2).

D8. Informatie over de veiligheid van de GGHP's voor de gezondheid van het dier, in het bijzonder wat betreft toxische, allergene of andere schadelijke effecten als gevolg van de

genetische modificatie, voorzover de GGHP's bedoeld zijn voor gebruik in diervoeders

Niet van toepassing. Bomen worden niet als diervoeder gebruikt. We sluiten echter niet uit dat een passerend dier occasioneel enkele (afgewaaide) bladeren van de bomen eet.

D9. Mechanisme van de interactie tussen de genetisch gemodificeerde plant en doelwitorganismen

Niet van toepassing. De modificatie is niet gericht op een bepaald doelwitorganisme.

D10. Eventuele veranderingen in de interacties van de GGHP's met niet-doelwitorganismen die voortvloeien uit de genetische modificatie.

Door bomen te wijzigen in hun houtsamenstelling bestaat de mogelijkheid dat interacties met niet-doelwitorganismen wijzigen. De volgende typen van interacties zouden potentieel gewijzigd kunnen worden:

- Interacties met grazende dieren;
- Interacties met bezoekende of residerende micro-organismen, insecten en/of vogels;
- Interacties met pathogene organismen;
- Interacties met bodemmicro-organismen en bodemfauna;
- Via wortellexudaten: interacties met plantpathogenen en/of symbionten inclusief mycorrhizae;
- Tijdens de afbraak van hout en bladmateriaal: effecten op de organismen die hout en bladmateriaal afbreken.

In de wetenschappelijke literatuur zijn verschillende data terug te vinden over de mogelijke effecten die lignine-modificaties potentieel hebben op de hierbovengenoemde interacties. Er zijn experimenten gedaan met lignine-gemodificeerde populier en berk. Wat afbraak van lignine-gemodificeerd hout betreft hebben verschillende gecontroleerde laboratoriumexperimenten gewezen in de richting van een versnelde afbraak van het hout op de korte termijn. Er wordt oa. gewezen op een mogelijke gemakkelijkere beschikbaarheid van de suikers in het hout als oorzaak van de versnelde afbraak op korte termijn (Hopkins et al, 2001.; Webster et al, 2005.; Hopkins et al, 2001, Hopkins et al, 2006.; Henault et al, 2006). Onder natuurlijke omstandigheden blijken er andere factoren zoals samenstelling van de bodem, klimaat, bodemvochtigheid, soort populier en genotype, van veel grotere invloed te zijn op de afbraaksnelheid dan modificatie in lignine (Tilston et al, 2004.; Hopkins et al, 2007.).

Een recent onderzoek naar afbraak van bladeren van CAD-gemodificeerde populieren en mogelijke effecten op insecten (Axelsson, 2010) gaf aan dat de bladeren van CAD-gemodificeerde populieren in een aquatisch milieu iets trager afbrak dan COMT (caffeic acid O-methyl transferase)-gemodificeerde en wildtype bomen. Er werden geen verschillen waargenomen tussen de hoeveelheid en soortenrijkdom van aquatische invertebraten op de verschillende soorten van decomposerende bladmassa.

Een onderzoek met lignine-gemodificeerde berken, gemodificeerd met een 4CL (4-coumarate:coenzyme A ligase)-gen heeft aangetoond dat de 4CL antisense transformatie en de mogelijke pleiotrope effecten van de transformatie op de groeikarakteristieken van de berk geen invloed had op de vorming van ectomycorrhizae met *P.involutus* en bovendien geen duidelijke invloed had op de bio-afbreekbaarheid van het bladafval (Seppanen et al, 2007).

Een onderzoek met lignine-gemodificeerde populier (*P.tremuloides*), gemodificeerd met antisense 4CL liet een effect zien op insect herbivoren afhankelijk van de transgene lijn, wat suggereert dat dit effect eerder het gevolg is van een insertie-effect, dan dat het gelinkt kan worden aan de 4CL suppressie of de lignine reductie (Brodeur-Campbell et al, 2006). Andere experimenten met lignine-gemodificeerde populieren, gewijzigd in CAD of

COMT lieten normale interacties met insecten zien en vertoonden geen verschillen in de microbiële samenstelling in de bodem onder de bomen (Pilate et al, 2002).

Laboratoriumonderzoek naar de microbiële bodemsamenstelling onder lignine-gemodificeerde populier liet zien dat de microbiële samenstelling in drie verschillende bodems sterk varieerde en dat de effecten niet consistent waren voor de vier geteste transgene lijnen (Bradley et al, 2007).

In de veldproef B/BE/07/V2 met bomen waarin het CCR (Cinnamoyl CoA Reductase) enzym neergeregeld is en die als gevolg daarvan ook een verlaagd ligninegehalte hebben is in twee seizoenen een endofytenbepaling uitgevoerd. Daarbij zijn er stalen genomen van de rhizosfeer, de wortel en de stengel. Hieruit werden vervolgens de cultiveerbare bacteriën geïsoleerd en werden de bacteriële populaties gekarakteriseerd. De conclusies zijn dat er in de rhizosfeer geen significante verschillen zijn in bacteriepopulaties tussen de ongewijzigde en de genetisch gewijzigde bomen. Noch voor wat betreft de hoeveelheid, noch voor wat betreft de diversiteit van de bacteriële populatie. Er werden wel significante verschillen gevonden tussen de hoeveelheid bacteriën die vanuit stengel en wortel konden worden opgegroeid wanneer hen een fenolische verbinding als enige koolstofbron werd aangeboden. Bij de genetisch gewijzigde bomen lag de hoeveelheid bacteriën die een fenolverbinding als enige koolstofbron kan gebruiken wat hoger.

In dezelfde veldproef werd ook een roestbepaling uitgevoerd waarbij de globale en maximale roestaantasting werd gemeten aan de hand van een schaal van 0 (geen roestaantasting) tot 7, met intervallen van 0.5. Er werden geen significante verschillen gevonden tussen de roestaantasting op de drie testlijnen (twee genetisch gemodificeerde lijnen en één controlelijn).

In een onderzoek naar de diversiteit van de schimmelpopulaties onder een Franse twee jaar oude korte-omloop veldproef met genetisch gewijzigde populieren bleek de soortenrijkdom boven verwachting groot. Er werden geen verschillen waargenomen tussen de soortenrijkdom van de schimmelpopulaties in de bodem, wortel en ectomycorrhizae onder wildtype populieren (vrouwelijke lijn 717-1B4) en twee CAD-gemodificeerde lijnen (lijnen ASCAD21 en ASCAD52) (Danielsen, 2012).

Een belangrijk overzicht van de mogelijke ecologische effecten van lignine-gemodificeerde bomen wordt gegeven in het review artikel van de hand van Claire Halpin in 2007 in het wetenschappelijk tijdschrift *Tree Genetics & Genomes* (Halpin et al, 2007). Wat interacties met insecten betreft besluit dit review artikel dat wijzigingen in de hoeveelheid en de samenstelling van de lignine geen of weinig effect hebben op bladetende insecten. Wat ziekten – en dus interacties met pathogenen – betreft lijken er geen aanwijzingen te zijn dat lignine-gemodificeerde bomen minder resistent zijn dan hun wildtype soortgenoten. Voor wat de afbraak van de wortels en stammen van lignine-gemodificeerde bomen is de hypothese dat gemodificeerd lignine wellicht minder goed in staat is dan wildtype lignine om de meer labiele celwandcomponenten te beschermen tegen microbiële en enzymatische afbraak. Toch lijken de variaties in milieuomstandigheden gedurende de veldproeven van grotere invloed te zijn op de houtafbraak dan de modificaties aan de lignine. Het review artikel besluit dan ook met de uitspraak dat in de natuurlijke omgeving de diversiteit van plantenmateriaal in de verschillende staten van bevochtiging en afbraak naar alle waarschijnlijkheid veel grotere invloed heeft op de bodem eigenschappen en de ecologische interacties met andere organismen dan de typen van genetische modificaties in lignine die tot nu toe bestudeerd zijn.

Er zijn in de wetenschappelijke literatuur geen gegevens gevonden over de mogelijke effecten van lignine-modificatie op vertebraten zoals hazen, konijnen of herten. Wel is bekend dat er een grote variatie bestaat in de voedingspreferenties voor bepaalde

hybriden en klonen. Zoals al eerder gezegd wordt vermoed dat dit wordt veroorzaakt door de variatie in de concentratie van fenolische glycosiden waarvan bekend is dat zij een rol spelen in de verdediging tegen vraat door zoogdieren (OECD, 2001). Wanneer een lignine-modificatie als pleiotroop effect een wijziging in de concentratie van fenolische glycosiden zou hebben, zou dit een effect kunnen hebben op het voedingsgedrag van deze zoogdieren. Er zijn geen redenen om te veronderstellen dat een wijziging in de hoeveelheid en/of samenstelling van lignine een toxisch effect zou hebben op zoogdieren. Wellicht is eerder sprake van het omgekeerde aangezien een verlaagd ligninegehalte de afbreekbaarheid van het hout zou kunnen bevorderen.

Zoals onder D7 aangegeven bestaan er vandaag in de natuur ook al bomen die een gewijzigde lignine-samenstelling hebben. Zo zijn er de CAD-mutant in *Pinus taeda* en de zwarte populier 71030-501 die homozygoot is voor de HCT1- Δ 73 mutatie. Als de CSE gemodificeerde lijnen al een iets andere (indirecte) interactie met niet-doelwit organismen zouden hebben in vergelijking met hun ouderlijn, dan zijn die interacties naar alle waarschijnlijkheid niet anders dan bij deze in de natuur voorkomende mutanten.

D11. Eventuele interacties met het abiotische leefmilieu.

Wij voorzien geen bijzondere interacties met het abiotische leefmilieu.

D12. Beschrijving van de detectie- en bepalingstechnieken voor de genetisch gemodificeerde plant.

Er is een aantal technieken voorhanden waarmee de genetisch gewijzigde populier kan worden gedetecteerd / geïdentificeerd. Het betreft met name Southern hybridisatie en PCR mbv primers die specifiek zijn voor de geïntroduceerde sequenties.

D13. Informatie over eerdere introducties van de genetisch gemodificeerde plant, indien van toepassing.

Er is met de genetisch gewijzigde lijnen hpCSE#1 en hpCSE#2 nog nooit eerder een veldproef uitgevoerd.

Er zijn in het verleden wel veldproeven uitgevoerd met CCR en CAD-gemodificeerde populierenlijnen, oa. in het Verenigd Koninkrijk, Frankrijk en België (veldproeven B/GB/96/R1/6, B/GB/95/R1/4, B/FR/99.02.15, B/FR/07.06.01, B/BE/07/V2 en B/BE/13/V1).

In de veldproef B/FR/99.02.15 is de agronomische prestatie geëvalueerd (groei en fenologie) en zijn de technische houtkenmerken geëvalueerd (samenstelling en karakteristiek van het hout en de pulping eigenschappen). Uit deze proeven is gebleken dat de ASCAD21 lijn een normale groei kent, terwijl de SCAD1 lijn een iets vertraagde groei kent. Beide lijnen hebben verbeterde pulpingeigenschappen (Leplé et al., 2007). De fenologie, voor zover men die heeft kunnen testen (bloemen zijn immers verwijderd), blijkt ongewijzigd. Er wordt een normale hoeveelheid bloemen geproduceerd en die verschijnen ook in dezelfde periode als bij de wild-type bomen.

Er zijn geen aanwijzingen gevonden voor een verhoogde gevoeligheid voor bepaalde ziekten (bacterie of schimmelziekten) of plagen (bijv insecten). De lijnen zijn gezond gebleven gedurende de gehele periode van de proef.

Zoals onder D.10 al vermeld, zijn er geen verschillen gevonden in de schimmelpopulaties in bodem, wortel en ectomycorrhizae onder CAD-gemodificeerde bomen in vergelijking met wildtype bomen (Danielsen, 2012).

De veldproeven B/BE/07/V2 (Zwijnaarde, 2009 – 2015) en B/BE/13/V1 hebben aangetoond dat het hout dat op de CCR en CAD gemodificeerde bomen wordt gevormd gemakkelijker om te zetten is naar bio-ethanol. De gemodificeerde bomen blijken in het veld minder snel te groeien dan de wildtype bomen.

In de veldproef met CCR-gemodificeerde bomen in Zwijnaarde zijn ook roest- en endofytenbepalingen uitgevoerd. Daaruit is gebleken dat er geen verschillen waren in de gevoeligheid voor roest tussen de gemodificeerde en wildtype bomen. Uit de endofytenbepalingen bleek dat er geen verschil is in hoeveelheid en soortenrijkdom van de micro-organismen aanwezig in de rhizosfeer, maar dat de gewijzigde houtsamenstelling wel een invloed heeft op de cultiveerbare bacteriële gemeenschappen in het plantenweefsel.

Op de CAD-gemodificeerde bomen in veldproef B/BE/13/V1 bleken op twee- en driejarige takken onverwacht al enkele bloeiwijzen te verschijnen wat erop zou kunnen wijzen dat de modificatie invloed heeft op het startmoment van de bloei. Op deze bomen sluiten de knoppen op een vroeger tijdstip in de nazomer en bloeien ze daarnaast vroeger in de lente van wildtype bomen.

Zowel in Zwijnaarde (veldproef B/BE/07/V2) als in Wetteren (veldproef B/BE/13/V1) zijn er in de veldproeven tijdens en na de veldproef behoorlijke aantallen wortelstekken waargenomen, hetgeen de bestaande informatie over dergelijke populieren, namelijk dat ze gemakkelijk wortelstekken vormen, bevestigt. De wortelstekken zijn telkens verwijderd en vernietigd.

E. INFORMATIE OVER HET INTRODUCTIEGEBIED

E1. Ligging en omvang van het introductiegebied

Het introductiegebied ligt op de grens van de gemeentes Melle en Wetteren op gronden die behoren tot het ILVO. Een liggingsplan is bijgevoegd in bijlage 5. Het introductiegebied zal niet meer dan 500 m² bedragen. De exacte locatie van de proef is weergegeven in de vertrouwelijke bijlage 12.

E2. Beschrijving van het ecosysteem van het introductiegebied

Het introductiegebied kan omschreven worden als landelijk/agrarisch gebied dat op maximaal enkele kilometers omsloten wordt door bebouwing in de vorm van industriezone en dorpskernen. De omgeving van de veldproef bestaat uit akker- en grasland waartussen zich af en toe een zoom van groen bevindt (bomen en/of stuikgewas), en dat doorkruist wordt door infrastructuur in de vorm van wegen. De Schelde bevindt zich ten noorden van de veldproef.

Wat flora en fauna betreft zijn er in het introductiegebied geen grote bijzonderheden. Er komen planten, dieren, en insecten voor zoals die gebruikelijk zijn in een verstedelijkt agrarisch gebied waarin bermen, boomstroken en kleine stukje bos voorkomen.

Er is sprake van een gematigd zeeklimaat met relatief zachte temperaturen in de winter (kans op lichte tot soms matige vorst) en gematigde temperaturen in de zomer (tot ongeveer 35 graden Celcius), een overheersende zuid-westelijke windrichting, en een over het jaar verspreide neerslag van ongeveer 800 liter per vierkante meter.

E3. Aanwezigheid van seksueel compatibele in het wild levende verwanten of gekweekte plantensoorten

Er staan in de directe omgeving van de proef verschillende soorten populieren, waaronder kaarspopulieren (een variant van *Populus nigra*, die niet seksueel compatibel zijn met de transgene populieren). Ook in de verdere omgeving van de proef bevinden zich op veel plaatsen, met name langs wegen en langs de Schelde veel populieren. Populier is immers een zeer veel aangeplante boom. Hiertussen kunnen zich ook enkele seksueel compatibele populieren bevinden zoals *P. tremula*, *P. alba* en *P. x canescens*. In de Scheldevallei kunnen zich ook nog enkele wilde exemplaren bevinden van de zwarte populier en de ratelpopulier. Langs de Schelde tussen Melle en Wetteren staat een rij grauwe abeelen (*P.x canescens*).

E4. Afstand tot officieel erkende biotopen of beschermde gebieden die kunnen worden beïnvloed

De dichtstbijzijnde waardevolle gebieden zijn de bossen ten zuiden van Gontrode (op meer dan 1 kilometer afstand), en het erkende Schelde-Durme estuarium (ten oosten van Gent tot aan de NL grens, op meer dan 1 kilometer ten noorden van de proef). De Kalkense meersen liggen op ongeveer 6 km afstand.

Nota bene: De veldproef wordt zodanig uitgevoerd (geen bloeiwijzen, bestrijding van wortelopslag) dat van een risico op beïnvloeding van erkende biotopen of beschermde gebieden geen sprake zal zijn.

F. INFORMATIE OVER DE INTRODUCTIE

F1. Doel van de introductie

Het doel van de veldproef is vergelijkbaar met dat van de reeds uitgevoerde veldproeven B/BE/07/V2 en B/BE/13/V1: nagaan of de genetisch gewijzigde populieren, aangepast in de aanmaak van lignine, onder reële praktijkomstandigheden een biomassa produceren die op een veel efficiëntere manier kan worden omgezet naar glucose. De veldproef is onderdeel van wetenschappelijk onderzoek dat kadert in pogingen om naar een duurzame bio-economie over te schakelen. Het overschakelen naar een industrie die op hernieuwbare groene grondstoffen gebaseerd is wordt gezien als een belangrijke methode om de uitstoot van broeikasgassen zoals CO₂ te kunnen verminderen, en zo bij te dragen tot het afremmen van de klimaatopwarming.

F2. Geplande datum/data en duur van de introductie

De geplande startdatum is mei 2021 de proef zal dan lopen tot en met april 2025.

F3. Methode die zal worden gebruikt voor de introductie van de genetisch gemodificeerde planten

De bomen zullen met de hand worden geplant.

F4. Methode voor de behandeling en het beheer van het introductiegebied vóór, tijdens en na de introductie, waaronder teelt- en oogstmethoden

Het introductiegebied zal voorafgaand aan de introductie een mechanische groundbewerking (cultivator / grondfrees) ondergaan met het doel de bestaande beplanting te elimineren, de grond zoveel mogelijk te homogeniseren en om de grond los te maken voor een goede beworteling.

Indien nodig zal een bemesting worden uitgevoerd.

Onkruid zal handmatig en met behulp van herbiciden worden bestreden. Rondom de proef zal rogge worden ingezaaid die kort zal worden gehouden door deze twee of drie keer per jaar te maaien. Hiermee wordt voorkomen dat er rondom de proef veel onkruid gaat woekeren. De rogge laat monitoring op eventuele wortelstekken gemakkelijk toe.

De oogst van de takken (einde jaar 1, en einde jaar 4) zal handmatig (takkenschaar, hand- of kettingzaag) gebeuren, waarna de takken ter plaatse zullen worden verhakfeld en deels in zakken of tonnen wordt verzameld en afgevoerd en deels ter plaatse blijft om te composteren. Eventueel zal een aantal takken of een deel ervan naar een laboratorium worden vervoerd voor nader onderzoek en/of om te stekken.

Na de oogst van de takken aan het einde van jaar 4 zullen de boomstronken machinaal worden gerooid, waarbij ook de wortels zoveel als mogelijk is, uit de bodem worden verwijderd. Na het verwijderen van de boomstronken en wortels zal de plot worden gefreesd en zal het gedurende een jaar braak worden gelegd. Op die wijze is het mogelijk in de navolgende jaren een goede monitoring (zie bijlage 7) uit te voeren op eventuele populieren die uit achterblijvende stukjes wortel weer zouden opgroeien.

F5. Aantal planten, bij benadering (of planten per vierkante meter)

Van de twee genetisch gemodificeerde lijnen en van de ouderlijn zullen elk 48 bomen worden geplant met een dichtheid van ongeveer 1,2 boom per m², waarrond nog een

bufferrij met niet genetisch gewijzigde bomen zal worden geplant (52 bomen). De totale oppervlakte van de proef zal ongeveer 400m² bedragen (zie bijlage 5).

G. INFORMATIE OVER PLANNEN VOOR BEHEERSING, CONTROLE, FOLLOW-UP EN AFVALBEHANDELING

G1. Genomen voorzorgsmaatregelen:

G1a) afstand(en) tot sexueel compatibele plantensoorten, zowel in het wild levende verwanten als cultuurgewassen;

Het is niet uitgesloten dat zich binnen een afstand van enkele kilometers van de proef sexueel compatibele populieren bevinden zoals *P. tremula*, *P. alba* en/of *P. x canescens*.

G1b) maatregelen om de verspreiding van een voortplantingsorgaan van de genetisch gewijzigde planten (b.v. pollen, zaad) tot een minimum te beperken of te voorkomen.

Doordat de bomen in korte omloopvegetatie zullen worden geteeld wordt niet verwacht dat ze zullen bloeien. Bij korte omloopvegetatie worden de bomen na een eerste jaar kort boven de grond afgeknipt en spruiten ze in het eerstvolgende groeiseizoen met verschillende takken uit. De bomen groeien feitelijk als een soort struik. De volgende snoei volgt na drie jaar. De takken op de bomen worden daarom niet ouder dan drie jaar. Aangezien de populier normaalgesproken pas na 5 tot 8 jaar bloeit en de leeftijd van de takken, en niet de stronk, hiervoor bepalend is, verwachten we dat de genetisch gewijzigde populieren in de veldproef niet zullen bloeien, ook al kunnen we dat niet met zekerheid uitsluiten. De ervaring met veldproef B/BE/13/V1 heeft immers laten zien dat een genetische modificatie die leidt tot een wijziging van de houtsamenstelling invloed kan hebben op het tijdstip waarop de bomen gaan bloeien. In die veldproef verschenen er immers wel al enkele bloeiwijzen op de nog jonge takken. Of dit fenomeen specifiek is voor een modificatie in het CAD-enzym is vandaag niet geweten. Wij zullen daarom net als in veldproef B/BE/13/V1 wekelijks op het verschijnen van eventuele bloeiwijzen monitoren vanaf het moment dat de eerste knoppen verschijnen tot het moment dat de populieren in blad staan. Bij populier verschijnen immers eerst de bloemen en dan pas het blad. Wanneer er bloeiwijzen worden aangetroffen zullen deze worden verwijderd en vernietigd (dmv stomen). Als er bloeiwijzen verschijnen, dan zijn dit alleen vrouwelijke bloemen die enkel zaden en geen pollen kunnen produceren. Deze eventuele vrouwelijke bloemen worden verwijderd voordat ze zaden zouden kunnen gaan verspreiden.

De populier in kwestie (grauwe abeel) kan zich ook via wortelstekken verspreiden. Eventuele wortelstekken die gedurende de proef ontstaan zullen verwijderd worden. Eventuele wortelstekken die nog zouden ontstaan na afloop van de proef uit stukjes wortel die in de grond zouden zijn achtergebleven, worden in de jaren na de proef gedood mbv een herbicide (zie bijlage 7 monitoringsplan).

Het is niet voorstelbaar dat de wortels van de transgene populieren zich ondergronds tot buiten de plot zouden begeven. De transgene bomen zullen immers omringd worden door een rij conventionele populieren wiens wortelstel zal beletten dat het wortelstel van de transgene populieren breed zal kunnen uitwaaiëren.

G2. Beschrijving van de methoden voor de behandeling van het gebied na de introductie

Na de introductie van de bomen zullen er maar weinig handelingen worden uitgevoerd op de plot. Dit beperkt zich tot:

- Onkruidbestrijding.
- Een mogelijke additionele bemesting van de plot.
- Visuele controle van de bomen.
- Het oogsten van een tak voor (biochemische) analyse en/of afbraaktesten
- Het kort boven de grond afknippen van de bomen na het eerste seizoen.
- Het oogsten van de gehele plot na het vierde seizoen.

G3. Beschrijving van de methoden voor de behandeling van de oogst en de afvalstoffen van de genetisch gemodificeerde plant

Het hout zal met de hand worden geoogst. Oogsten betekent het afzagen van de takken van de plant en het laten staan van de stam. Het geoogste materiaal zal geheel of gedeeltelijk worden afgevoerd (in de vorm van takken, ofwel in gehakselde vorm). Het gehakselde materiaal zal in zakken, plastic tonnen, of een andere houder worden opgevangen en vervoerd. Het gehakselde materiaal zal zorgvuldig worden opgevangen, en gemorst materiaal wordt zo goed mogelijk opgeruimd. Kleine restanten zullen op de plot achtergelaten worden ter compostering. Het geoogste materiaal zal vervoerd worden naar:

- Een laboratorium voor verdere (biochemische) analyse en/of afbraaktesten (takken en/of gehakseld hout).
- Een proefinstallatie voor de productie van bio-ethanol (gehakseld hout).

Het vervoer van gehakseld hout zal plaatshebben in een gesloten (vracht)auto, van waaruit geen materiaal verloren kan gaan. Er zal in enkele gevallen sprake zijn van open transport van geoogst materiaal wanneer het gaat om het vervoer over zeer korte afstand van een of enkele takken voor analysedoeleinden. Dit vervoer zal zorgvuldig plaatsvinden opdat geen materiaal verloren gaat.

Materiaal dat niet wordt afgevoerd voor verder onderzoek zal ter plaatse worden verhakseld en ter plaatse worden gecomposteerd.

Na de tweede oogst zullen ook de stammen met hun wortelgestel worden gerooid. Dit zal machinaal gebeuren. De kans bestaat dat kleine stukjes wortel in de grond aanwezig blijven.

Om eventueel achtergebleven materiaal te vernietigen zal de plot worden gefreesd. Het gerooid materiaal zal verhakseld worden. Het verhakselde stammateriaal zal net als de geoogste takken gebruikt worden voor (biochemische) analyse en/of omzetting tot ethanol. Het verhakselde wortelmateriaal zal voor een deel gebruikt worden (biochemische) analyse. De rest zal ter plaatse worden gecomposteerd, en/of ten dele worden afgevoerd als bedrijfsrestafval (dat niet gestort wordt, maar in alle gevallen wordt verbrand).

Met de bladeren die elke herfst van de transgene bomen zullen vallen zal niets gedaan worden. Deze zullen zich mbv de wind over relatief kleine afstand kunnen verspreiden en zullen vervolgens volgens de wetten van de natuur afgebroken worden.

G4. Beschrijving van controleplannen en –technieken

De proef zal visueel worden gecontroleerd. Deze visuele controle zal op regelmatige tijdstippen plaatshebben. In de periode van het verschijnen van de eerste knoppen totdat de populieren in blad staan zal elke week gecontroleerd worden op de afwezigheid van bloemen. In de overige periodes zal tweemaandelijks gecontroleerd worden. Daarnaast zal de proef na een storm gecontroleerd worden op eventueel afgewaaide takken. Afgewaaide takken zullen verwijderd worden (ter vernietiging, of voor analyse in het laboratorium).

G5. Beschrijving van noodmaatregelen

Er staat rond het domein van de proef een draadhekwerk van 1.8m hoog en de toegangspoort is op slot. Deze maatregel heeft tot doel de toegang tot de veldproef aan toevallige passanten te ontnemen. Op deze wijze wordt voorkomen dat ongewenst of ongewild proefmateriaal wordt verslept naar een andere locatie.

Er zou zich in de praktijk een aantal calamiteiten kunnen voordoen. Een eerste is dat de omheining moedwillig wordt doorbroken of kapotgemaakt, eventueel door personen die moedwillig de proef zouden willen beschadigen. Zodra dit wordt opgemerkt zal de schade ongedaan worden gemaakt.

Een tweede mogelijke calamiteit is dat er door storm takken van de bomen afbreken. Doordat er een bufferrij rond de proef staat is de kans klein dat er een tak buiten de proef geraakt (zie bijlage 6). Afgewaaide takken worden opgeruimd en vernietigd door middel van verhakseling, of eventueel gebruikt voor toepassing in ingeperkt gebruik. Stormschade aan de omheining wordt door ons, aangezien het om een draadhek gaat, zeer onwaarschijnlijk geacht.

Een derde mogelijke calamiteit is dat er bij het transport van het verhakselde transgene hout een ongeval zou plaatshebben met het voertuig en het verhakselde hout op de straat zou vallen. Ook al gaat het in dit geval niet meer om GGO's en kunnen er uit dit materiaal ook geen GGO's meer ontstaan, we zullen toch altijd enkele lege vaten voorradig hebben om het verhakselde hout snel te kunnen opruimen.

G6. Methoden en procedures om het gebied te beschermen

Het domein waarop de veldproef plaatsheeft is omgeven door draadhek met een hoogte van 1.80 meter. De toegangspoort is op slot. Dit draadhek heeft tot doel te voorkomen dat toevallige passanten de proef zouden kunnen betreden en transgeen materiaal (per ongeluk of met opzet) vanuit de proef naar elders zouden kunnen verspreiden. Op het draadhek is op verschillende plaatsen een bordje gehangen met het opschrift: "verboden toegang voor onbevoegden".

H. ONDERTEKENING

H1. Namens de rechtspersoon VIB:

Naam: Jo Bury

Functie: managing director

Opgemaakt te Gent, op

Handtekening:



7 januari 2021

H2. Verantwoordelijk onderzoeker:

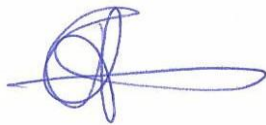
Naam: Wout Boerjan



Handtekening:

H3. Bioveiligheidscoördinator:

Naam: René Custers



Handtekening:

Referenties

- Axelsson E.P. et al, 2010. Can leaf litter from genetically modified trees affect aquatic ecosystems? *Ecosystems*, 13 : 1049-1059
- Baulcombe D., 2004, RNA silencing in plants, *Nature*, vol 431, 16 September 2004, pp.356-363
- Bouvarel P. et Lemoine M., 1957. Sélection et amélioration des peupliers de la section Leuce en France. Actes du VIème Congrès International du Peuplier, Paris, 325-341
- Bradley KL, Hancock JE, Giardina CP, Pregitzer KS: Soil microbial community responses to altered lignin biosynthesis in *Populus tremuloides* vary among three distinct soils. *Plant and Soil* 2007, 294(1-2):185-201.
- Brodeur-Campbell et al, Insect herbivory on low-lignin transgenic aspen, *Environmental Entomology*, 2006, 35(6): 1696-1701, 2006.
- Delplanque A, 1998. Les insectes associés aux peupliers. Memor ed., 350p.
- Danielsen L. et al, 2012, Fungal soil communities in a young transgenic poplar plantation form a rich reservoir for fungal root communities. *Ecology and Evolution*; 2(8): 1935-1948
- EFSA, 2004: Opinion of the Scientific Panel on GMOs on the use of antibiotic resistance genes as markers in genetically modified plants, *The EFSA Journal* (2004) 48, 1-18
- EFSA, 2009: Consolodated presentation of the joint Scientific Opinion of the GMO and BIOHAZ Panels on the "Use of Antibiotic Resistance Genes as Marker Genes in Genetically Modified Plants" and the Scientific Opinion of the GMO Panel on "Consequences of the Opinion on the Use of Antibiotic Resistance Genes as Marker Genes in Genetically Modified Plants on Previous EFSA Assessments of Individual GM Plants", EFSA-Q-2009-00589 and EFSA-Q-2009-00593
- FAO, International Poplar Commission (ed.), *Poplars and willows in wood production and land use*, 1979,
See: https://books.google.be/books?id=OEKMuu-FrtgC&printsec=frontcover&hl=nl&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Fog et al, 2010, Characterization of the relationship between integrase, excisionase and antirepressor activities associated with a superinfecting Shiga toxin encoding bacteriophage, *Nucleic Acids Research*, 2010, 1–14
- Forest Ecology and Forest Management Group, Wageningen UR: Tree fact sheet, *Populus x canescens*
- Gill G.P. et al, 2003. A sequence mutation in the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene associated with altered lignification in loblolly pine. *Plant Biotechnology Journal*, 1, pp.253-258
- Gynheung et al: Organ-Specific and Developmental Regulation of the Nopaline Synthase Promoter in Transgenic Tobacco Plants, *Plant Physiology*, 88(3): 547-552, 1988
- Halpin et al, Ecological impacts of trees with modified lignin, *Tree Genetics & Genomes*, 2007, 3:101-110.
- Hartley et al, 2000, DNA Cloning Using In Vitro Site-Specific Recombination, *Genome Res.* 2000 10: 1788-1795

- Henault C, English L, Halpin C, Andreux F, Hopkins D (2006), Microbial community structure in soils with decomposing residues from plants with genetic modifications to lignin biosynthesis. *FEMS Microbiol Let* 263:68–75
- Hopkins et al, Influence of available substrates on the decomposition in soil of plant materials with genetic modifications to lignin biosynthesis, *European Journal of Soil Science*, 2006, 1-9.
- Hopkins et al, Decomposition in soil of tobacco plants with genetic modifications to lignin biosynthesis, *Soil Biology & Biochemistry* 33 (2001) 1455-1462.
- D.W. Hopkins, et al.: Genetically modified lignin below ground, *Nature Biotechnology* 25, 168 - 169 (2007))
- Katzen 2007, Gateway® recombinational cloning: a biological operating system, *Expert Opin. Drug Discov.* (2007) 2(4):571-589
- Laurans F, Pilate G, 1999. Histological aspects of a hypersensitive response in poplar to *Melampsora larici-populina*. *Phytopathology*, 89, 233-238.
- Leplé et al, Downregulation of CCR in poplar: Multiple level phenotyping reveals effects on cell wall polymer metabolism and structure, *The Plant Cell*, Vol.19, 3669-3691, November, 2007
- Li B. et al, 2009, Generation of a marker-free transgenic maize with improved salt tolerance using the FLP/FRT recombination system, *J. Biotechnol.* Jan 15, 145(2): 206-213
- Lutz et al 2004, A novel approach to plastid transformation utilizes the Φ C31 phage integrase, *The Plant Journal* (2004), 37, 906-913
- Nanto et al, 2005, *Agrobacterium*-mediated RMCE approach for gene Replacement, *Plant Biotechnology Journal* (2005) 3, pp. 203–214
- Marroni F., et al, 2011. Large-scale detection of rare variants via pooled multiplexed next-generation sequencing: towards next-generation Ecotilling. *The Plant Journal* 67:736-745.
- Moss E.H., Longevity of Seed and Establishment of Seedlings in Species of *Populus*, *Botanical Gazette*, Vol. 99, No. 3 (Mar., 1938), pp. 529-542
- OECD, *Consensus document on the biology of Populus L. (Poplars)*, ENV/JM/MONO(2000)10, 5 March 2001
- Ow D., 2007, GM maize from site specific recombination technology, what next? *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, 18:115-120
- Ow D., 2011, Recombinase-mediated Gene Stacking as a Transformation Operating System, *Journal of Integrative Plant Biology* 2011, 53 (7): 512–519
- Piazolla et al, 2006, Expression of phage P4 integrase is regulated negatively by both *Int* and *Vis*, *Journal of General Virology* (2006), 87, 2423–2431
- Pilate et al, Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification, *Nature Biotechnology*, June 2002, vol.20, 607-612.
- Saleme et al, Silencing CAFFEYOYL SHIKIMATE ESTERASE Affects Lignification and Improves Saccharification in Poplar, *Plant Physiology*, November 2017, Vol. 175, pp. 1040–1057.

Seppänen et al, Decomposition of the leaf litter and mycorrhiza forming ability of silver birch with a genetically modified lignin biosynthesis pathway, *Applied Soil Ecology*, 36 (2007), 100-106.

SNIF B/FR/99/02/15

SNIF B/FR/07/06/01

SNIF B/FR/07/06/01 Final report

Stettler, Bradshaw, Heilman, Hinckley; *Biology of Populus and its implications for management and conservation*, NRC-CNRC, NRC Research Press, Ottawa, 1996

Sunilkumar et al, 2002, Developmental and tissue-specific expression of CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP, *Plant Molecular Biology*, volume 50, nr 3, October 2002, p.463-479.

Tilston et al, Genetic modifications to lignin biosynthesis in field-grown poplar trees have inconsistent effects on the rate of woody trunk decomposition, *Soil Biology & Biochemistry* 36 (2004) 1903-1906.

Tomescu et al: Leaf eating insect damage on different poplar clones and sites. *Ann For Sci* 2007, 64(1):99-108

Vanholme B., et al, 2013. Breeding with rare defective alleles: A natural *Populus nigra* HCT mutant with modified lignin as a case study. *New Phytologist*, 198(3). P.765-776.

Vergunst et al, 2000, Cre/lox-mediated recombination in *Arabidopsis*: evidence for transmission of a translocation and a deletion event, *Chromosoma* (2000) 109:287–297

Villar M., Lemoine M., 1993. Transfert de gènes entre peupliers cultivés et peupliers sauvages en France : risques liés à la culture de peupliers transgéniques. "Synthèse bibliographique". In : Possibilités et limites pour la dissémination de peupliers génétiquement modifiés en plantations artificielles (D. Cornu), Rapport de fin de contrat CTPS "Dissémination de plantes génétiquement modifiées", 21p + annexes

Webster et al, Decomposition in soil of soluble, insoluble and lignin-rich fractions of plant material from tobacco with genetic modifications to lignin biosynthesis, *Soil Biology & Biochemistry* 37 (2005) 751-760.

Wei et al: Transgenic sterility in *Populus*: expression properties of the poplar *PTLF*, *Agrobacterium* NOS and two minimal 35S promoters in vegetative tissues, *Tree Physiology*, 26, 401-410, 2006

Yau et al 2011, Method for Bxb-1 mediated site specific integration in planta, *Methods Mol Biol*, 2011;701:147-66

Zaklina Marjanovi et al: Mycorrhiza formation enhances adaptive response of hybrid poplar to drought, *Ann. N.Y. ACSE. Sci.* 1048: 496–499 (2005)

Bijlagen

1. Gezondheids- en leefmilieurisicoanalyse
2. Gedetailleerde beschrijving van de genetische modificatie
3. Monolignol synthese pathway
4. Omgevingsplan van de veldproef
5. Plan van de proef
6. Proefprotocol
7. Monitoringsplan
8. Verklaring inzake burgerlijke aansprakelijkheid
9. Verklaring beschikbaarheid controlestalen
10. Detectie- en bepalingstechnieken voor de genetisch gewijzigde plant
11. SNIF formulier
12. Vertrouwelijke gegevens
13. Betaling van dossiertaks