

BIJLAGE 1: GEZONDHEIDS_ EN LEEFMILIEURISICOBEOORDELING

1. Persistentie en invasiviteit van de gewijzigde planten, met inbegrip van genoverdracht van plant naar plant

De gewijzigde maïsplanten hebben een mutatie in het ZmNAC52 gen. Dit gen codeert voor een transcriptiefactor die een rol speelt in de regulatie van de groei van de plant op het moment dat DNA schade optreedt. Het uitschakelen van het gen resulteert in een groeiverbetering onder omstandigheden dat DNA schade optreedt. Dit zou dus kunnen betekenen dat deze maïsplanten beter doorgroeien in een omgeving waar bepaalde schadelijke chemische stoffen voorkomen of onder omstandigheden van sterke hitte of sterke blootstelling aan UV licht.

Maïs bezit niet de eigenschappen om zich in de natuur in België te vestigen. De plant kan hooguit een keer als opslagplant in een navolgend gewas aanwezig zijn. Het zijn naar alle waarschijnlijkheid eerder de onaangepastheid van maïs aan vocht en koude, dan een gebrek aan tolerantie tegen DNA schade veroorzakende omgevingsstress die aan de basis liggen van het onvermogen van maïs om zich in de Belgische natuur te vestigen. Het is dan ook moeilijk voor te stellen dat maïsplanten met een verbeterde groei tijdens perioden van DNA stress persistenter zouden worden of invasiever in natuurlijke habitats.

Er zal vanuit de veldproef geen genoverdracht naar andere maïsplanten plaatshebben omdat de mannelijke bloemen verwijderd worden voordat ze stuifmeel kunnen gaan verspreiden. Ook de overdracht via zaden is uitgesloten omdat de zaden stevig vastzitten in een kolf en alle kolven zorgvuldig zullen worden geoogst.

2. Genoverdracht van planten naar micro-organismen

Er zijn in de planten geen sequenties ingebracht die een eventuele genoverdracht vanuit de planten naar micro-organismen zouden kunnen bevorderen. Er is alleen een mutatie aangebracht in het ZmNAC52 gen. De kans dat dit gemuteerde gen zou worden overgedragen op micro-organismen verschilt niet van de kans dat een ongewijzigd ZmNAC52 gen, of enig welk ander regulier planten-gen op micro-organismen zou worden overgedragen. Die kans is verwaarloosbaar klein.

3. Interacties van de gewijzigde planten met doelwitorganismen

De wijziging die in de maïsplanten is aangebracht is niet gericht op een doelwitorganisme.

4. Interacties van de gewijzigde planten met niet-doelwitorganismen

Er worden geen effecten verwacht op de interacties tussen de genetisch gewijzigde maïsplanten en niet-doelwitorganismen. De planten produceren geen factoren die gericht zijn op een bepaald doelwit-organisme waarbij ook niet-doelwit-organismen zouden kunnen worden geraakt. Het gaat om planten die onder omstandigheden die DNA stress veroorzaken beter blijven doorgroeien dan niet-gewijzigde maïsplanten.

5. Effecten van de specifieke teelt-, beheer- en oogsttechnieken

De teelt van deze maïs leidt naar ons oordeel niet tot wijzigingen in de teelt-, beheers- en oogsttechnieken.

6. Effecten op biogeochemische processen

Wij voorzien geen bijzondere effecten op biogeochemische processen. Wel kan het zo zijn dat de gewijzigde planten beter groeien dan niet-gewijzigde planten in bodems waarin verontreinigingen aanwezig zijn die DNA schade zouden kunnen veroorzaken.

7. Effecten op de gezondheid van mens en dier

Geen. Er zijn geen redenen om te veronderstellen dat het door blijven groeien van planten onder omstandigheden die DNA stress veroorzaken een effect zou kunnen hebben op de gezondheid van mens of dier.

De blootstelling aan gemodificeerde maïsplanten beperkt zich tot het manueel manipuleren van zaden en kolven en het in contact komen met stengels, bladeren en bloemen.

8. Conclusie

Op grond van de in het technisch dossier weergegeven informatie en de hierboven weergegeven analyse verwachten wij geen negatieve gevolgen voor de menselijke gezondheid en het leefmilieu als gevolg van de geplande introductie.

Bijlage 2: Moleculaire karakterisatie

De genetische wijzigingen in de planten zijn gekarakteriseerd door middel van PCR-amplificatie van de doelsequenties, gevolgd door sequentiebepaling van het PCR product. Daarmee is vastgesteld dat de planten ter hoogte van de doelsequenties een mutatie bevatten die tot gevolg hebben dat het ZmNAC52 gen niet meer functioneel is.

Voor het verkrijgen van genomisch DNA uit de maïsplanten is gebruik gemaakt van een standaard genomisch DNA isolatieprotocol. Zie 1. hieronder.

1. Isolatie van genomisch DNA

Voor de isolatie van het genomisch DNA uit de maïs voor het bepalen van de geïnsereerde sequenties en de bepaling van het aantal insertkopijen werd het volgende protocol gebruikt:

- 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 amplificatie

De PCR amplificatie is vervolgens als volgt uitgevoerd:

Gebruikte PCR mix:

1µl	primer1 (10uM)
1µl	primer2 (10uM)
0.4µl	10mM dNTP's
4µl	5XGC Buffer
0,2µl	iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase
12,4µl	MQ-water
<u>1µl</u>	<u>gDNA (200ng/ul)</u>
20µl	<i>totaal</i>

PCR-programma:

Stap 1: 5' 98 °C

Stap 2: 15'' 98 °C

30'' 60 °C

1' 72 °C

Stap 2, 34 keer herhalen

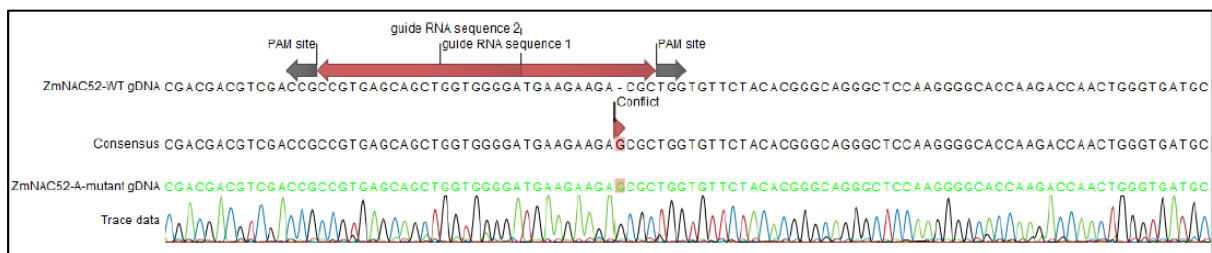
Stap 3: 5' 72 °C

Stap 4: Product opslaan bij 10 °C

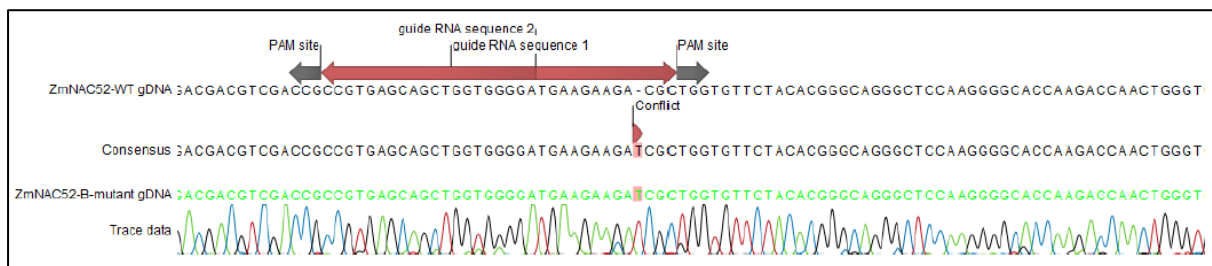
target sequence	amplicon length	primer seq
ZmNAC52	668bp	Fw- CCTCAACAAGTGCGAACCATG Rv- CCCTTTGTGGTGACCTTGC
EF1alfa	107bp	FW-AGTCCGTTGAGATGCACCATG RV-CACATACCCACGCTTCAGATCC

EF1 alfa is als controle meegenomen om de geschiktheid van het DNA voor PCR aan te tonen.

De geamplificeerde PCR producten zijn vervolgens volgens standaardprotocollen gesequenced waarbij de volgende mutaties zijn gebleken:



Figuur 1: de mutatie in lijn ZmNAC52-A, een insertie van G ter hoogte van de locatie van de dubbelstrengs breuk



Figuur 2: de mutatie in lijn ZmNAC52-B, een insertie van T ter hoogte van de locatie van de dubbelstrengs breuk

Daarnaast is er op het genomisch DNA van elke lijn qRT-PCR uitgevoerd worden om de afwezigheid van het T-DNA en/of vector backbone na te gaan. Dit om aan te tonen dat het bij de planten in de proef gaat om planten die geen soortvreemd DNA bevatten, en enkel de gewenste mutatie bevatten. Als positieve controle wordt DNA van de oorspronkelijke plant met T-DNA gebruikt, als negatieve controle wordt DNA van een B104 plant gebruikt. De gevonden Ct-waarden worden eerst genormaliseerd tegenover EF1-alfa en vervolgens genormaliseerd tegenover de positieve controle.

Gebruikte qRT-PCR mix:

0.5 µl template (25~50ng/ul)
 2 µl primer 1 + primer 2 (0.5 µM)
 2.5 µl SYBR Green master mix
 5 µl totaal

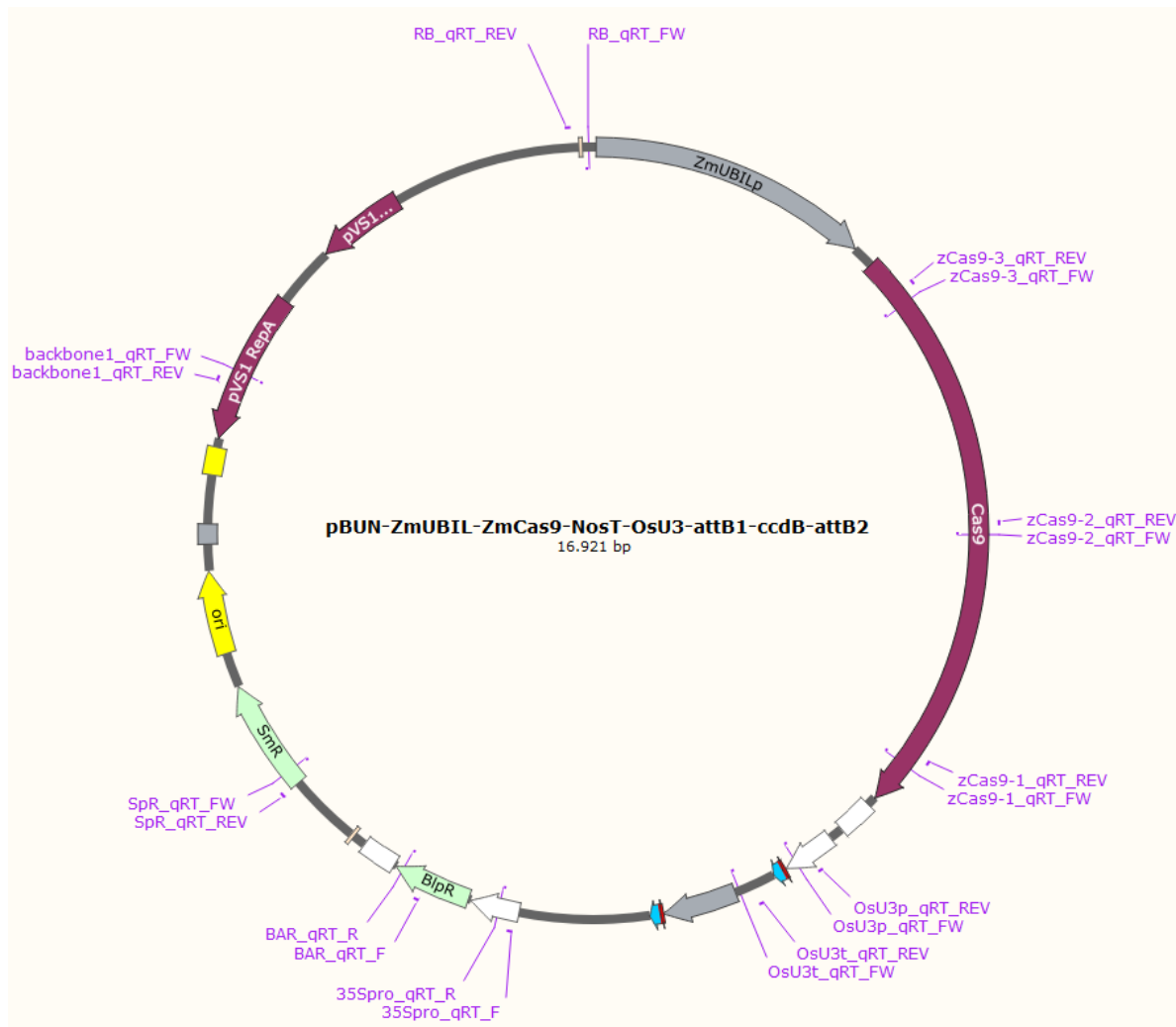
Gebruikt qRT-PCR programma

Stap 1 5 min 95 °C
 Stap 2 10 sec 95 °C
 15 sec 60 °C
 10 sec 72 °C

Stap 2, 45x herhalen

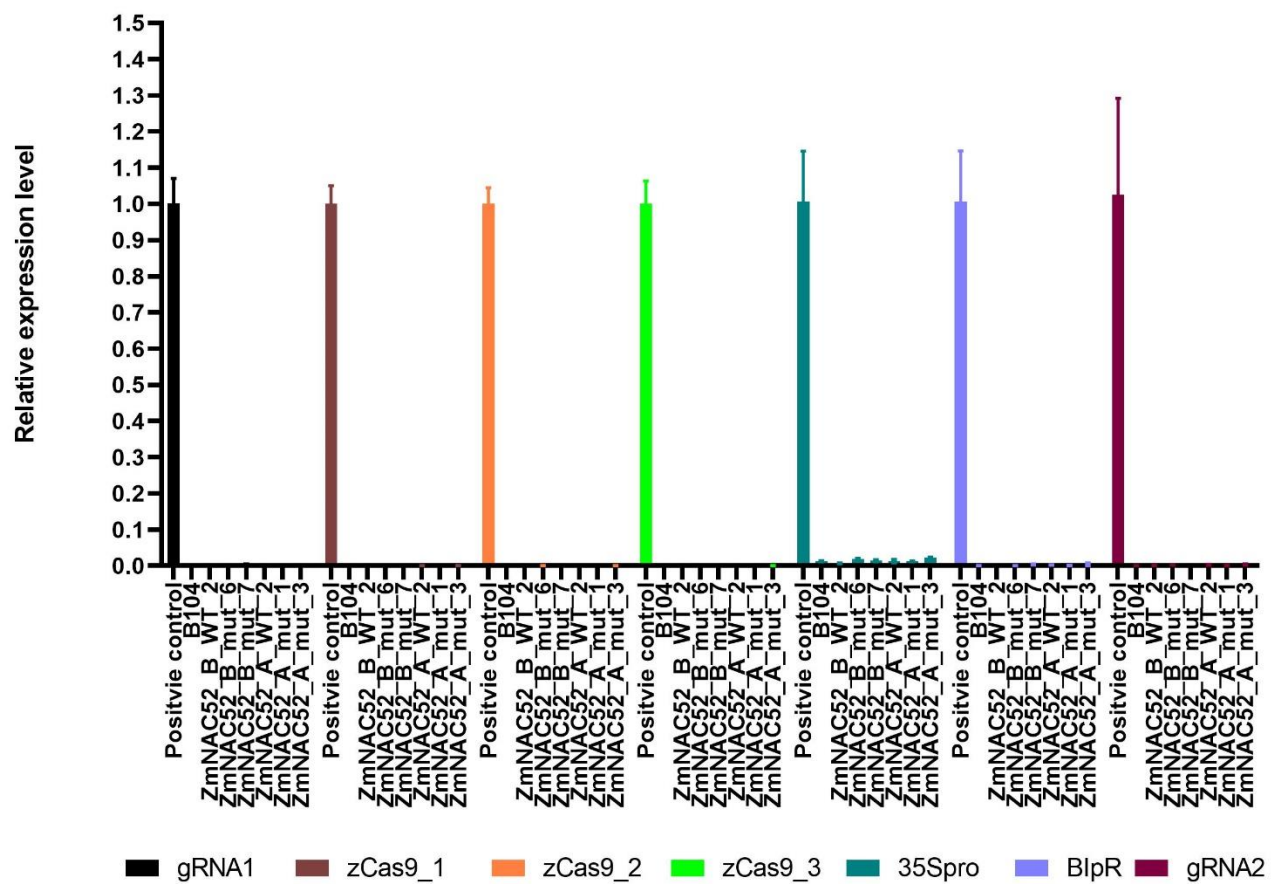
Target	Amplicon size (bp)	Primer name	Sequence
CaMV 35S pro	119	35Spro_qRT_F	GGAAACCTCCTCGGATTCCA
		35Spro_qRT_R	TCTTCAACGATGGCCTTTCC
BlpR	189	BAR_qRT_F	CTCTACACCCACCTGCTGAA
		BAR_qRT_R	GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC
Backbone	112	backbone1_qRT_FW	TTAAACACCACGCACGTTGC
		backbone1_qRT_REV	CGCTCTTTACGATCTTGTAAGCG
SpR	110	SpR_qRT_FW	ACAAATGTACGGCCAGCAAC
		SpR_qRT_REV	GTAAACATCATGGGGAAGCG
zCas9	112	zCas9-1_qRT_FW	taatgcttgctgctcgac
		zCas9-1_qRT_REV	tgccgtccaagtatgtgaac
	93	zCas9-2_qRT_FW	ctgcatgaaattgcggttcg
		zCas9-2_qRT_REV	aagctcatcaacggcattcg
	97	zCas9-3_qRT_FW	tgttgccgaagattggatgc
		zCas9-3_qRT_REV	atggcgaaggttgacgattc
gRNA2	125	OsU3t_qRT_FW	ttccaaatgctgtgccgtac
		OsU3t_qRT_REV	ttcatgccgtttgtccaac
gRNA1	116	OsU3p_qRT_FW	tcgtccaattgcgtaatggg
		OsU3p_qRT_REV	acgttggaaccacgtgatg
RB	146	RB_qRT_FW	GATTGTCGTTTCCCGCCTTC
		RB_qRT_REV	GCACATACAAATGGACGAACGG
EF-a	107	EF-a-FW	AGTCCGTTGAGATGCACCATG
		EF-a-REV	CACATACCCACGCTTCAGATCC

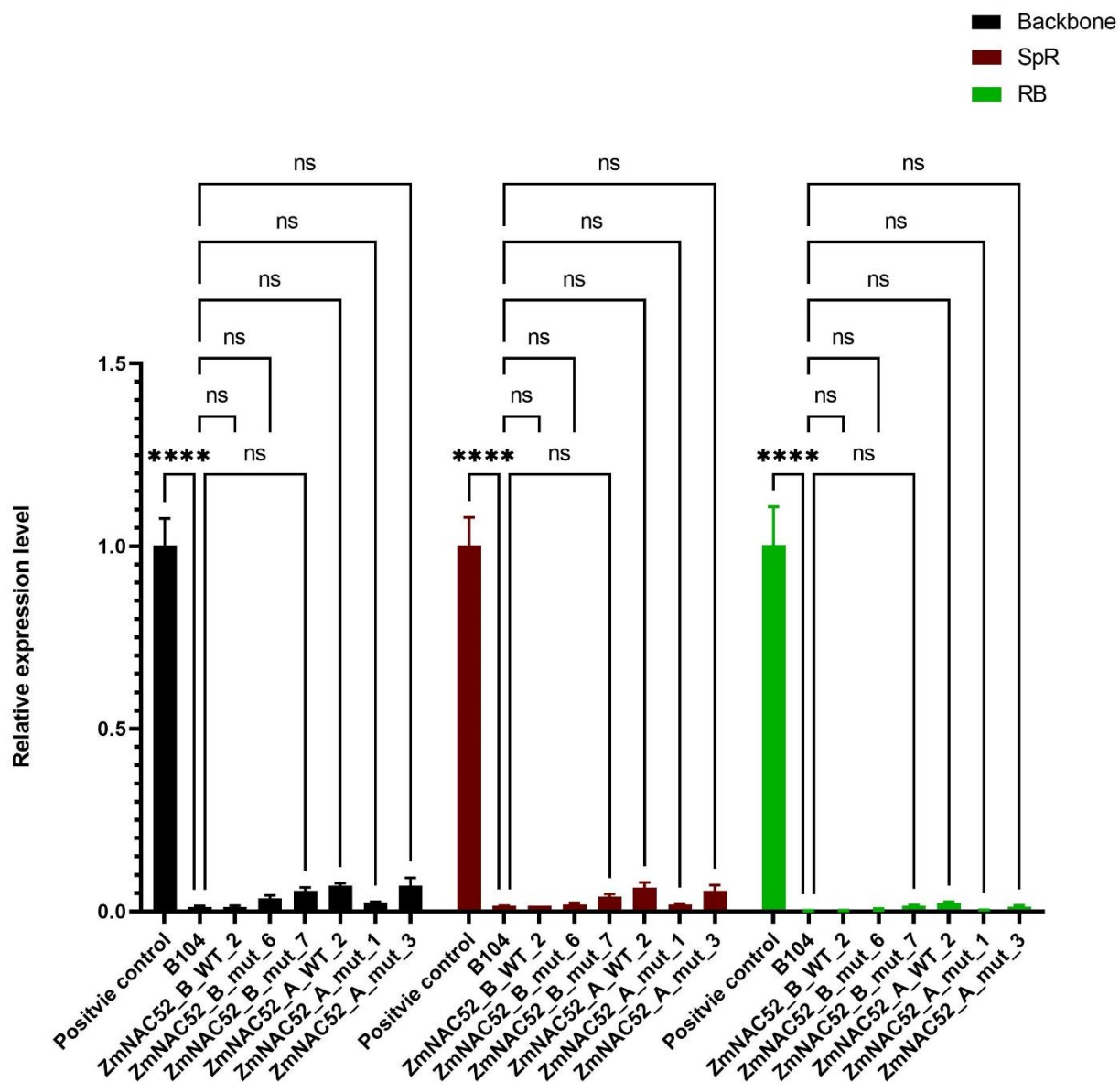
Figuur 3: De verschillende primerparen die gebruikt zijn geweest voor het bepalen van de afwezigheid van T-DNA en backbone sequenties, en aanduiding van hun positie op het gebruikte construct



De qPCR resultaten van de planten zijn hieronder weergegeven in figuur 4. Geen van beide lijnen bevat T-DNA en/of backbone sequenties.

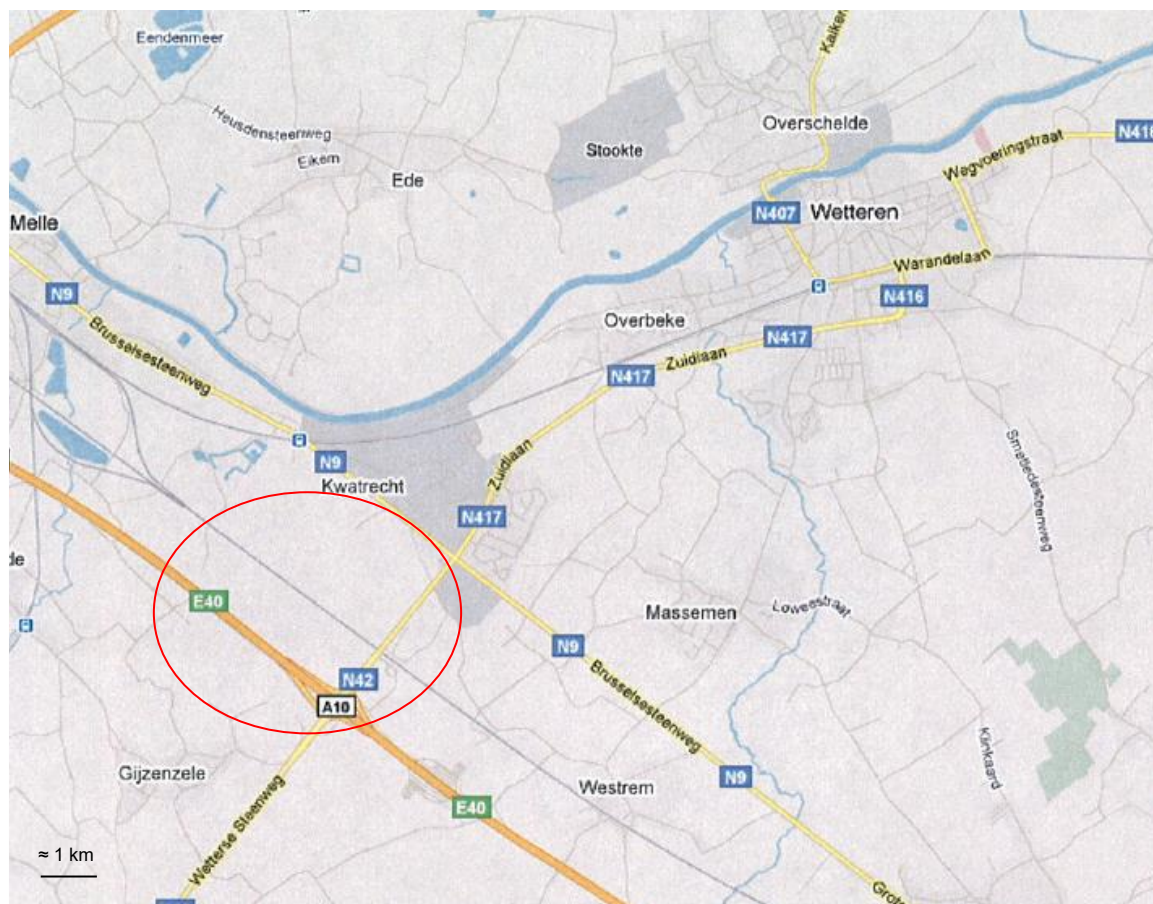
Figuur 4: De resultaten van de qPCR op de ZmNAC52-A en ZmNAC52-B planten





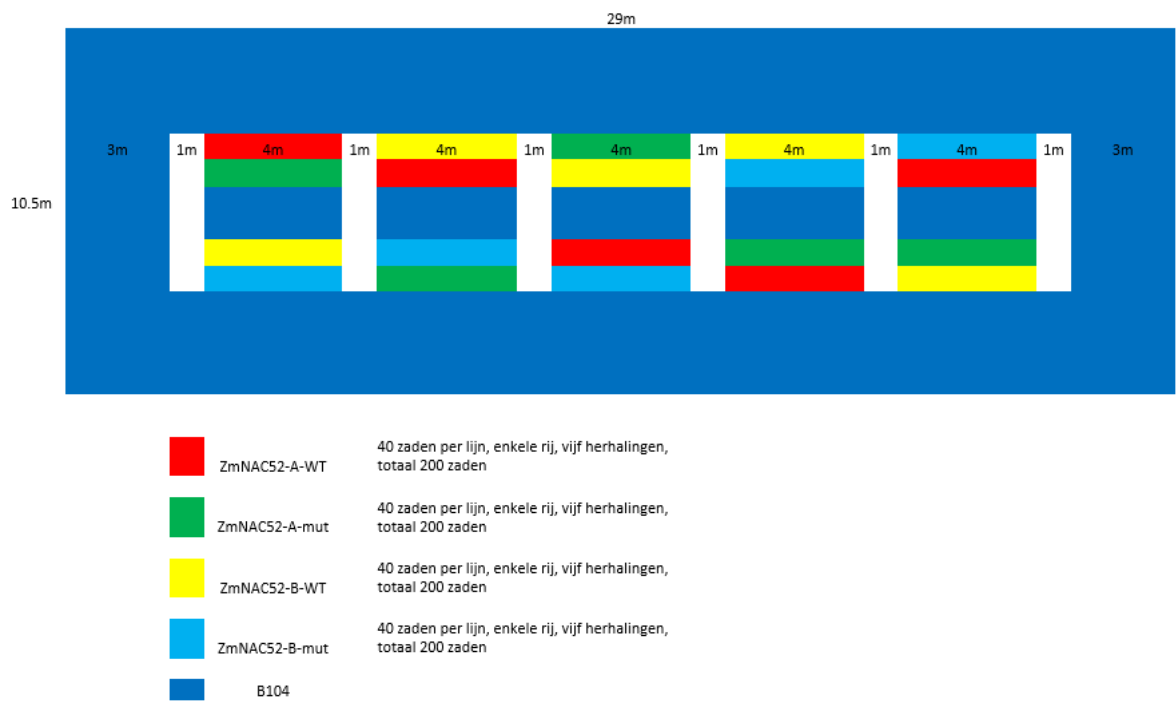
Significantiewaarden bepaalt via two-way ANOVA

BIJLAGE 3: LIGGINGSPLAN



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

BIJLAGE PLOTPLAN



BIJLAGE 5: PROEFPROTOCOL

1. Verantwoordelijkheden

De rechtspersoon VIB is de verantwoordelijke voor de proef.

2. Logboek

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

- Zaaierwerkzaamheden
- Onkruidbestrijding
- Ziektebestrijding
- Inspecties van de proef (monitoring)
- Begeleide veldproefbezoeken door derden
- Oogstwerkzaamheden

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

- Onverwachte calamiteiten

In het logboek zullen de volgende gegevens worden genoteerd:

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

Een kopie van het logboek wordt als bijlage gevoegd bij het jaarlijks activiteitenverslag.

3. Zaai van de proef

De start van de zaaierwerkzaamheden 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 een voldoende fijn zaaibed te vormen.

De maïszaadjes zullen in duidelijk gelabelde gesloten zakken verpakt zijn die in een bak per auto worden aangevoerd naar de veldproefplot in Wetteren.

4. Werkzaamheden tijdens de groeiperiode

Bemesting

Er wordt indien nodig gedurende de groei van de planten een aanvullende bemesting uitgevoerd.

Onkruidbestrijding

Onkruid zal worden bestreden zoals gebruikelijk is in maïs. Dit kan bestaan uit een of meerdere herbicidetoepassingen, eventueel aangevuld met mechanische onkruidbestrijding.

Monitoring

De proef zal visueel worden gecontroleerd. Deze visuele controle zal op regelmatige tijdstippen (minimaal twee keer per maand) plaatshebben met een intensivering in de periode dat de mannelijke bloeiwijzen verschijnen. Vanaf het moment van het verschijnen van het laatste blad zal drie keer per week worden gemonitord op het verschijnen van mannelijke bloeiwijzen en worden eventuele mannelijke bloeiwijzen verwijderd, afgevoerd en geïnactiveerd. Met de monitoring op bloeiwijzen wordt gestopt op het moment dat alle mannelijke bloeiwijzen verwijderd zijn, of op 15 september, ook al zouden op dat moment nog niet alle mannelijke bloeiwijzen verwijderd zijn.

5. Oogst en vervoer van de maïsplanten

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

De oogst van de maïsplanten zal handmatig gebeuren. Eerst zal een aantal planten in hun geheel worden geoogst waarbij de stengels, bladeren en kolven van elkaar gescheiden worden. Deze worden elk apart gewogen en ter plaatse verhakseld. Het verhakselde materiaal zal in zorgvuldig gesloten, duidelijk gelabelde zakken worden verpakt en in bakken in een gesloten vervoermiddel worden afgevoerd voor verder onderzoek. Van alle andere planten worden handmatig en heel zorgvuldig alle kolven verwijderd – ook de allerkleinste. Deze kolven zullen in zorgvuldig gesloten, duidelijk gelabelde zakken in bakken in een gesloten vervoermiddel worden afgevoerd naar het VIB-UGent onderzoekscentrum Plantensysteembioïologie in Zwijnaarde. Op het veld achterblijvende stengels en bladeren zijn niet reproductief en als zodanig om die reden geen GGO meer. Ze worden op het veld verhakseld en ter plaatse composteren. Wortel en onderste deel van de stengel zullen in de grond achtergelaten worden en composteren. De zaden worden opgeslagen en kunnen gebruikt worden in verder laboratoriumonderzoek. Materiaal dat niet meer nodig is zal worden vernietigd.

6. Volgende teelt

De veldproef zal gedurende drie achtereenvolgende jaren op hetzelfde perceel, maar om wetenschappelijke redenen niet op exact dezelfde lokatie worden uitgevoerd. Er wordt in het volgende seizoen maïs of een ander gewas zoals gras, tarwe of aardappelen op de veldproeflocatie ingezaaid.

7. Afwijkingen

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

8. 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.

9. Eindverslag

Na afloop van de laatste oogst van de proef wordt een eindrapport opgesteld van de proef naar het rapport formaat 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 6: MONITORINGSPLAN

Monitoring gedurende de proef

De proef zal visueel worden gecontroleerd. Deze visuele controle zal op regelmatige tijdstippen (minimaal twee keer per maand) plaatshebben met een intensivering in de periode dat de mannelijke bloeiwijzen verschijnen. De monitoring op bloeiwijzen zal starten vanaf het moment van de vorming van het laatste blad. De proefplot zal dan drie maal per week bezocht worden om te controleren op mannelijke bloeiwijzen. De mannelijke bloemen worden manueel verwijderd van zodra ze zichtbaar worden en de ervaring heeft geleerd dat wanneer er om de andere dag wordt gecontroleerd er nooit een mannelijke bloem een stadium zal kunnen bereiken dat hij pollen gaat kunnen verspreiden.

Met de monitoring op, en het verwijderen van mannelijke bloeiwijzen zal worden gestopt wanneer alle mannelijke bloeiwijzen verwijderd zijn en sowieso op 15 september, ook al zouden op dat moment nog niet alle mannelijke bloeiwijzen verwijderd zijn. De reden is dat de eventuele verspreiding van stuifmeel op dat moment geen aanleiding meer kan geven tot de verspreiding van genetisch gewijzigd materiaal omdat de kolven in de omringende maïs en de verre omgeving allang bevrucht zijn geweest en volop met zaden gevuld zullen zijn.

Monitoring na afloop van de proef

Er zal in het jaar volgend op de proef geen monitoring meer plaatshebben. Jarenlange ervaring heeft aangetoond dat er in het jaar volgende op de proef geen opslagplanten verschijnen. Om die reden zal de plot gewoon maïs of een ander gewas zoals gras, tarwe of aardappelen ingezaaid worden en zal er geen monitoring op opslagplanten plaatshebben.

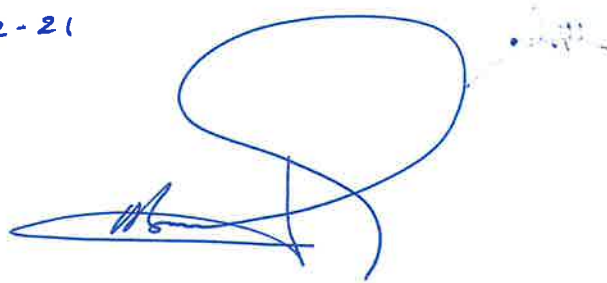
BIJLAGE 7: VERKLARING INZAKE BURGERLIJKE AANSPRAKELIJKHEID

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: 23-12-21

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 8: 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: 03/08/22

Handtekening:

Handwritten signature of Jo Bury in blue ink, consisting of a stylized 'J' and 'B' followed by a horizontal line.

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 9: Detectie en bepalingstechnieken

Op basis van het hieronder beschreven protocol kan nagagaan worden of maïsplanten al dan niet edits bevat in het ZmNAC52 gen.

Stap 1: Isoleer DNA uit het plantenmateriaal volgens onderstaand protocol

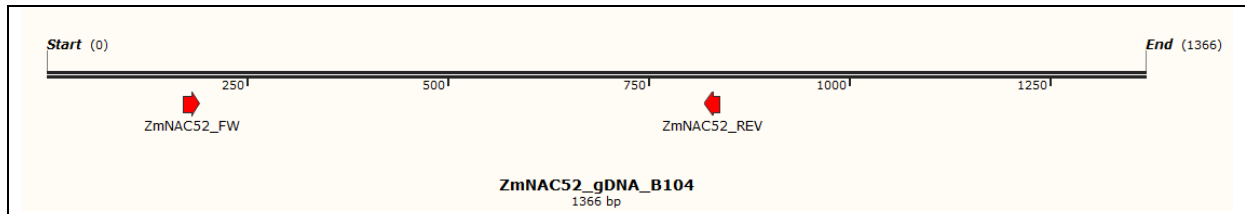
- Process leaf tissue by freezing with liquid nitrogen and grinding into a fine powder using a microcentrifuge tube pestle or a mortar and pestle. Add 40 mg of this leaf powder to a 1.5 mL microcentrifuge tube.
- Add 300 µL of Nuclei Lysis Solution, and vortex 1–3 seconds to wet the tissue.
- Incubate at 65°C for 15 minutes.
- Add 3 µL of RNase Solution to the cell lysate and mix the sample by inverting the tube 2–5 times. Incubate the mixture at 37°C for 15 minutes. Allow the sample to cool to room temperature for 5 minutes before proceeding.
- Add 100 µL of Protein Precipitation Solution, and vortex vigorously at high speed for 20 seconds.
- Centrifuge for 3 minutes at 13,000–16,000 × g. The precipitated proteins will form a tight pellet.
- Carefully remove the supernatant containing the DNA (leaving the protein pellet behind) and transfer it to a clean 1.5ml microcentrifuge tube containing 300 µL of room temperature isopropanol. Note: Some supernatant may remain in the original tube containing the protein pellet. Leave this residual liquid in the tube to avoid contaminating the DNA solution with the precipitated protein.
- Gently mix the solution by inversion until thread-like strands of DNA form a visible mass.
- Centrifuge at 13,000–16,000 × g for 1 minute at room temperature.
- Carefully decant the supernatant. Add 300 µL of room temperature 70% ethanol and gently invert the tube several times to wash the DNA. Centrifuge at 13,000–16,000 × g for 1 minute at room temperature.
- Carefully aspirate the ethanol using either a drawn Pasteur pipette or a sequencing pipette tip. The DNA pellet is very loose at this point and care must be used to avoid aspirating the pellet into the pipette.
- Invert the tube onto clean absorbent paper and air-dry the pellet for 15 minutes.
- Add 25 µL of DNA Rehydration Solution and rehydrate the DNA by incubating at 65°C for 1 hour. Periodically mix the solution by gently tapping the tube. Alternatively, rehydrate the DNA by incubating the solution overnight at room temperature or at 4°C.
- Store the DNA at 2–8°C for short term storage or at -20°C for long term storage.

Stap 2: Voer een PCR uit op het geïsoleerde genomisch DNA

Er moeten een positieve en negatieve controle worden meegenomen in de PCR. Als negatieve controle kan bijvoorbeeld genomisch DNA worden gebruikt van ouderlijn B104, of enig andere niet-genetisch gewijzigde maïslijn. En als positieve controle kan genomisch DNA gebruikt worden afkomstig van de ZmNAC52-A en ZmNAC52-B maïslijnen. Het experiment moet minimaal in duplo worden uitgevoerd.

Target, primers, temperaturen en amplicongrootte van de PCR:

Target	Sequentie	T _{smelt}	T _{annealing}	Amplicon
ZmNAC52	CCTCAACAAGTGCGAACCATG	62	60	668bp
	CCCTTTGTGGTGCACCTTGC	58		



Figuur 1: alignering van de FW en RV primers op het ZmNAC52 gen

Voer de PCR op het genomisch DNA uit volgens de onderstaande condities:

PCR mix per reactie

5 X GC buffer	4 µL
10 mM dNTPs	0.4 µL
10 µM FW primer	1 µL
10 µM RV primer	1 µL
gDNA (200ng/ul)	1 µL
iProof™ Polymerase	0.2 µL
H ₂ O	12.4 µL
Totaal volume	20 µL

PCR programma

Stap 1: 5'	98 °C
Stap 2: 15''	98 °C
	30'' 60 °C
	1' 72 °C
Stap 3:	Stap 2, 34 keer herhalen
Stap 4: 5'	72 °C
Stap 5:	Product bewaren bij 4 °C

Scheiding van de PCR producten

Scheidt de PCR producten vervolgens op een 1% agarose gel (30 min, 150V) voor wildtype maïs en mogelijks ZmNAC52 mutant materiaal. Maak hierbij gebruik van een DNA ladder en maak het DNA zichtbaar met een DNA bindende kleurstof zoals Ethidiumbromide, Sybr Safe of Gel Green. Snijdt de bandjes uit de agarose gel en isoleer het DNA eruit. Bepaal vervolgens de sequentie van de PCR producten om na te gaan of er een mutatie aanwezig is in het ZmNAC52 gen (The primer sequence for sequencing: GTGCTAAGCTAAGCTAAGCTAA) . Wordt er een additionele G of T op plaats 380 in het ZmNAC52 gen aangetroffen dan kan het om materiaal gaan dat van de ZmNAC52-A of respectievelijk de ZmNAC52-B lijn afkomstig is.

Disclaimer

Indien een additionele G of T in het ZmNAC52 gen aangetroffen wordt in plantenmateriaal, dan geeft dat nog geen zekerheid dat het daadwerkelijk om ZmNAC52-A of ZmNAC52-B materiaal gaat. Dergelijke mutaties kunnen immers ook spontaan ontstaan.

BIJLAGE 10: Betaling van dossiertaks

De dossiertaks zal worden betaald na ontvankelijk verklaring van het dossier en het ontvangen van een factuur voor deze dossiertaks.

Summary Notification Information Format

A. General information

A1. Details of notification

Notification Number

B/BE/22/V1

Member State

Belgium

Date of Acknowledgement

.....

Title of the Project

Scientific field evaluation of maize with increased resistance against DNA damage causing environmental stress

Proposed period of release:

15/04/2022 to 31/10/2024

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: | <i>Poaceae</i> |
| b) genus: | <i>Zea</i> , section <i>Zea</i> |
| c) species: | <i>Zea mays</i> |
| d) subspecies: | <i>mays</i> |
| e) cultivar/breeding line: | inbred line B104 |
| f) common name: | maize |

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

The genetically modified maize plants have a significantly better growth under environmental stress conditions that lead to DNA damage.

B3. Type of genetic modification

Targeted editing of a gene using CRISPR-Cas resulting in the addition of one base pair.

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

There is no donor DNA inserted into the genetic material, but the genome editing using CRISPR-Cas has resulted in the addition of one base pair in the target site.

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

The plants have been modified using CRISPR-Cas. The CRISPR-Cas machinery was introduced into the maize using *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic modification. This resulted in the stable integration of T-DNA containing the sequences coding for the guide RNA and CAS protein into the genome of the maize. Plants with the desired edit were selected and the T-DNA was segregated out in the next generations leading to the selection of plants that only contained the desired edit but no longer contained any foreign genetic material.

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

Not applicable.

C. Experimental Release

C1. Purpose of the release

The purpose of the release is to measure the performance of the modified maize plants under normal field conditions and learn whether also in these conditions they would have an improved growth.

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 plot, including non-modified controls, non-modified fertilizer lines and non-modified buffer rows is 310 m².

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 GM lines have not been field tested 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. The modified characteristics are not expected to lead to greater weediness or the ability of the maize to establish in non-agricultural habitats. The modified characteristics are also not expected to change the interaction of the maize with herbivores or other non-target organisms and also not to change the toxicity and allergenicity of the maize.

There will also be no spread of the modified maize to the environment. The male flowers (tassels) of the maize will be removed before they can start shedding pollen, meaning that shedding of modified pollen to the environment is impossible. Also the spread of seeds to the environment is prevented. The modified seeds are well retained in the cobs and all cobs will be carefully hand harvested to prevent any spread of seeds.

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

The risk of spread of the modified properties to the environment is mitigated by removing the tassel, thus preventing the spread of modified pollen to non-modified maize plants in the surroundings. The formed modified seeds are, as already stated above, well retained in the cobs and these cobs will be very carefully hand harvested, thus preventing any spread of seeds to the environment. Experience with such field trials in the past 8 years has shown that the way the cobs are harvested effectively prevents any volunteers being formed. The field trial plot is 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 maize.

G. Final report

-

H. European Commission administrative information

To be filled in by the Commission

I. Consent given by the Competent Authority:

To be filled in by the Commission.