

BIJLAGE 1: GEZONDHEIDS- EN LEEFMILIEURISICOBEOORDELING

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

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

De genetisch gewijzigde populieren hebben een verlaagde hoeveelheid lignine en een verhoogde hoeveelheid cellulose in hun celwand. Cellulose, hemicellulose en lignine vormen samen de drie hoofdbestanddelen van hout, waarbij de lignine als een soort cement functioneert tussen de cellulose- en hemicellulosevezels. De lignine polymeer is opgebouwd uit een koppeling van verschillende monolignolen. In de gemodificeerde populieren is er een verminderde hoeveelheid lignine in het hout aanwezig, waardoor het hout onder alkalische omstandigheden meer efficiënt in suikers kan worden omgezet. Om het plastisch uit te drukken: er is wat minder cement tussen de cellulose- en hemicellulosevezels aanwezig waardoor het voor enzymen gemakkelijker is om de vezels te bereiken en die af te breken in hun suikers.

De verlaagde hoeveelheid lignine wordt veroorzaakt door een mutatie in het TRA2 gen dat het enzym transaldolase produceert. Populier heeft meerdere TRA genen die in staan voor de flux door de pentose fosfaat pathway. Het TRA2 gen blijkt vooral een rol te spelen wanneer er een extra hoge flux door de pentose fosfaat pathway noodzakelijk is zoals het geval is in lignificerende cellen. Wanneer in Arabidopsis het TRA2 gen uitgeschakeld wordt, resulteert dit wel in een verlaging van de hoeveelheid lignine, maar niet in een verlaging van de hoeveelheid flavonoiden, waarvan de vorming ook afhankelijk is van de pentose fosfaat route. Er zijn derhalve vooralsnog geen aanwijzingen dat het uitschakelen van het TRA2 gen gevolgen zou hebben buiten het verlagen van het lignine gehalte en de procentueel grotere hoeveelheid cellulose.

Er zijn ook in de natuur in populier en in andere boomsoorten mutaties aangetroffen in genen betrokken bij de biosynthese van lignine, met wijziging van de houtsamenstelling tot gevolg. Populier is van zichzelf geen invasieve plant en er zijn geen aanwijzingen dat bomen met dergelijke mutaties persistenter of invasiever zijn.

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

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

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

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

De kans op overdracht van genetisch gewijzigd materiaal op seksueel compatibele populieren is zo goed als onbestaande. De stammen of takken op de bomen zullen niet ouder dan 3 jaar worden wat betekent dat de kans klein is dat er gedurende de veldproef bloemen gevormd worden. De populier begint normaalgesproken pas na 5 tot 8 jaar te bloeien, en het is de leeftijd van de tak die bepaalt wanneer deze gaat bloeien, niet de leeftijd van de onderstam. Zoals onder 1. al is aangegeven is die kans echter niet nul, getuige het feit dat in veldproef B/BE/13/V1 met in het CAD-enzym gemodificeerde bomen in Wetteren gedurende de proef wel een aantal bloemen werd aangetroffen. In veldproef B/BE/07/V2 met CCR-gemodificeerde bomen in Zwijnaarde werd nooit een bloem aangetroffen. Ook in de nog lopende veldproef B/BE/21/V1 is geen enkele bloem aangetroffen. Mocht er toch een bloem op de populieren verschijnen, dan zullen deze bloemen verwijderd worden ruimschoots voordat ze eventueel zaden zouden kunnen verspreiden. De bomen in kwestie kunnen geen pollen verspreiden omdat het vrouwelijke bomen zijn.

De tweede mogelijke verspreidingsweg via wortelstekken is ook afgedekt. Eventuele wortelstekken zullen worden vernietigd, ook de eventuele wortelstekken die na de proef nog zouden kunnen ontstaan uit eventueel achtergebleven wortelresten. De monitoring zal plaatshebben totdat er een volledig jaar geen bomen meer zijn opgekomen uit wortelstekken en er voldoende zekerheid is dat er geen genetisch gewijzigde bomen meer zullen opkomen. Het opkomen van eventuele wortelstekken is beperkt tot de locatie van de proef. Wij concluderen dat de wijze van uitvoering van de proef tot gevolg heeft dat er geen overdracht van genetisch gewijzigd materiaal kan plaatshebben op seksueel compatibele populieren en dat er dus ook geen sprake zal kunnen zijn van overdracht van eventuele selectieve voordelen of nadelen.

Mocht er toch overdracht van genetisch materiaal naar andere populieren plaatshebben, dan zullen de ontvangende bomen daar naar ons oordeel geen selectief voordeel van ondervinden. Het CAS9 enzym is niet functioneel, de gRNAs doen zonder functioneel CAS9 niets, en het *hph* gen geeft in de natuur geen voordeel. De verlaagde hoeveelheid lignine zou een selectief nadeel kunnen zijn indien dit zou leiden tot een veel lagere groeisnelheid of het veel gemakkelijker afbreken van takken of de stam. In de serre vertonen de bomen geen lagere groeisnelheid, en bomen met lagere lignine-gehalten komen in de natuur ook voor.

4. Eventuele genoverdracht van de planten naar micro-organismen

Succesvolle genoverdracht van de genetisch gemodificeerde planten naar micro-organismen wordt bijzonder onwaarschijnlijk geacht. De mogelijkheden voor horizontale genoverdracht zijn in verschillende wetenschappelijke experimenten onder laboratoriumcondities uitgetest. In de meeste, zoniet alle gevallen is in de experimentele opzet sprake geweest van enige homologie tussen de in de planten geïntroduceerde sequenties en sequenties aanwezig in de potentieel ontvangende bacteriën. In dergelijke laboratoriumomstandigheden is enige horizontale genoverdracht waargenomen. In reële veldcondities zullen dergelijke omstandigheden niet bestaan, of zijn ze op zijn minst bijzonder onwaarschijnlijk. Als er al horizontale genoverdracht plaatsheeft, dan moet dit het gevolg zijn van non-homologe recombinatie.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10. Samenvattende risico-analyse

De ontvangende plant of ouderplant

Grauwe abeel (*Populus x canescens*) is een overjarige plant die normaal pas na 5 tot 8 jaar begint te bloeien. Het is een hybride ontstaan uit de kruising tussen *Populus tremula* en *Populus alba*. Grauwe abeel is tweehuizig en allogaam, dat wil zeggen dat de bomen mannelijk of vrouwelijk zijn. Het zijn kruisbevruchtende windbestuivers. Populieren produceren grote hoeveelheden stuifmeel dat over grote afstand met behulp van de wind kan worden verspreid. De bomen produceren fijne zaden die verpakt zitten in een katoenpluis. De zaden worden via de wind verspreid over relatief grote afstanden. In dit geval worden vrouwelijke bomen gebruikt wat betekent dat ze geen stuifmeel kunnen produceren. Een tak van een grauwe abeel kan onder natuurlijke omstandigheden, in tegenstelling tot bepaalde andere populierensoorten of wilgen, niet zomaar wortel schieten. Dat lukt enkel onder optimale omstandigheden met toepassing van stekpoeder. Grauwe abeel kan wel gemakkelijk wortelstekken maken, dat wil zeggen dat vanuit een oppervlakkig liggende wortel een scheut opschiet die een nieuwe boom kan vormen (een kloon).

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

Doelstelling en ontwerp van de veldproef

De proef vindt plaats in het kader van wetenschappelijk onderzoek dat wil bijdragen tot de overschakeling naar een meer duurzame, op hernieuwbare grondstoffen gebaseerde economie. In de veldproef zullen twee genetisch gewijzigde lijnen (twee onafhankelijke transformanten, gemaakt met hetzelfde construct) worden gegroeid in een gerandomiseerd blokdesign, waarbij per lijn 48 bomen zullen worden uitgeplant in zogenoemde 'korte omloopvegetatie', aangevuld met 48 bomen van de ouderlijn. Het voornaamste doel is na te gaan of de populieren ook in normale buitenomstandigheden normaal groeit en hout produceert dat gemakkelijker kan worden omgezet in suikers, bioethanol en andere nuttige producten. De korte omloopvegetatie houdt in dat de bomen dicht op elkaar worden geplant en op een gegeven ogenblik dicht bij de grond worden afgezaagd om vervolgens weer uit te sprouiten. Er wordt voor gezorgd dat de stam en/of takken nooit ouder dan drie jaar worden.

De genetische modificatie en de moleculaire karakterisatie daarvan

De bomen hebben een gewijzigde ligninesamenstelling als gevolg van een mutatie in de TRA2A en TRA2B genen waardoor deze niet langer functioneel zijn. Het gevolg is dat er minder lignine en verhoudingsgewijs ook wat meer cellulose in de bomen aanwezig is. De bomen bevatten ook het *hph* gen. Het *hph* gen komt in de planten tot expressie en maakt de planten bestand tegen de werking van het antibioticum hygromycine. Dit gen heeft de functie van selectiemerker, die de selectie van planten die de modificatie hebben opgenomen erg vergemakkelijkt.

Moleculaire karakterisatie heeft aangetoond dat het genconstruct in 2Bin drie genkopijen aanwezig is, terwijl het in 40A in één genkopij aanwezig is. In beide lijnen zijn geen sequenties aanwezig afkomstig uit de 'backbone' van het voor de modificatie gebruikte genconstruct.

Potentiële risico's als gevolg van de geplande veldproef

Potentiële risico's voor de gezondheid van mens of dier

Er zijn geen redenen om te veronderstellen dat een gewijzigde houtsamenstelling een toxisch, allergeen of ander schadelijk effect zou hebben op de menselijke gezondheid. Pollen van populier staat bekend als een gematigd allergeen, maar omdat de modificatie aangebracht is in vrouwelijke bomen die geen pollen kunnen produceren kan er in deze bomen geen sprake zijn van een effect op pollenallergeniteit. Mutaties in genen betrokken bij de lignine biosynthese komen in de natuur ook al voor, evenals de daardoor veroorzaakte wijziging in de houtsamenstelling.

De aanwezigheid van het antibioticumresistentiegen *hphI* brengt ook geen onaanvaardbare risico's met zich mee. De kans dat potentieel schadelijke bacteriën een *hph-II* gen uit de plant opnemen en zodanig wijzigen dat het functioneel is in de bacteriën, is bijna onvoorstelbaar. Daarnaast is het zo dat resistentiegenen tegen het antibioticum hygromycine wijd verspreid zijn in de natuurlijke microflora, wat betekent dat de kans dat een bacterie zo'n gen oppikt uit de natuurlijke microflora vele malen groter is dan dat het zo'n gen oppikt uit een genetisch gewijzigde plant.

Potentiële risico's voor het leefmilieu

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

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

Beheer, monitoring en controle

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

Conclusie

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

Bijlage 3: de downregulatie van TRA2 en de gevolgen hiervan voor de lignine-biosynthese

Transaldolase heeft twee isovormen, TRA1 en TRA2, en katalyseert een plastide-gelocaliseerde reactie van de niet-oxidatieve tak van de pentosefosfaatroute (PPP), die aanleiding geeft tot erythrose-4-fosfaat, een voorloper van de shikimaatroute. Stroomafwaarts van het shikimate-pad geven de algemene fenylpropanoïde route en de monolignol-specifieke route aanleiding tot de vorming van de ligninemonomeren (de Vries et al., 2018).

In *Arabidopsis* lijkt TRA1 constitutief tot expressie te komen in alle celtypen, terwijl TRA2 eerder tot expressie komt wanneer een hogere flux door de route nodig is, bijvoorbeeld in verhoutende cellen. *Arabidopsis* tra2-mutanten hebben een reductie van 15% van lignine zonder enige biomassaschade (Vanholme et al., 2012).

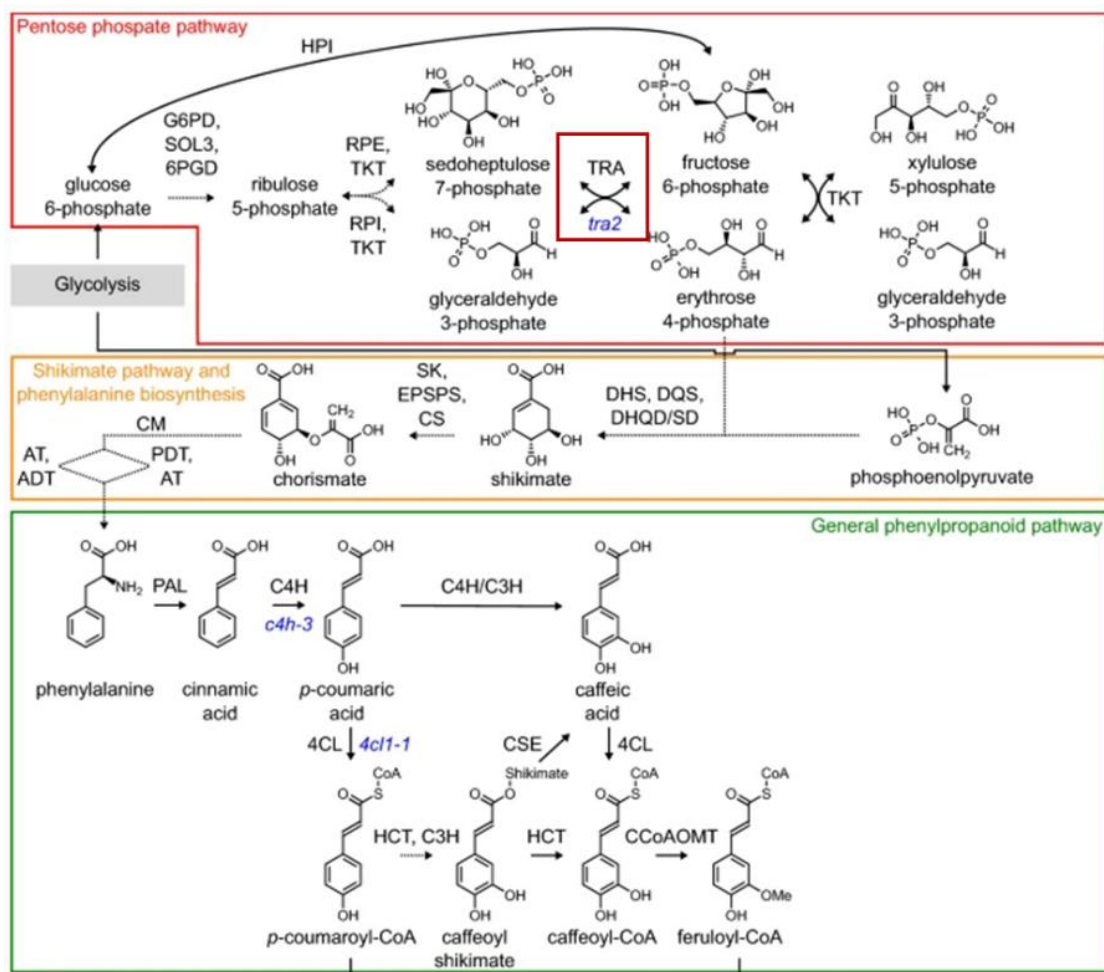
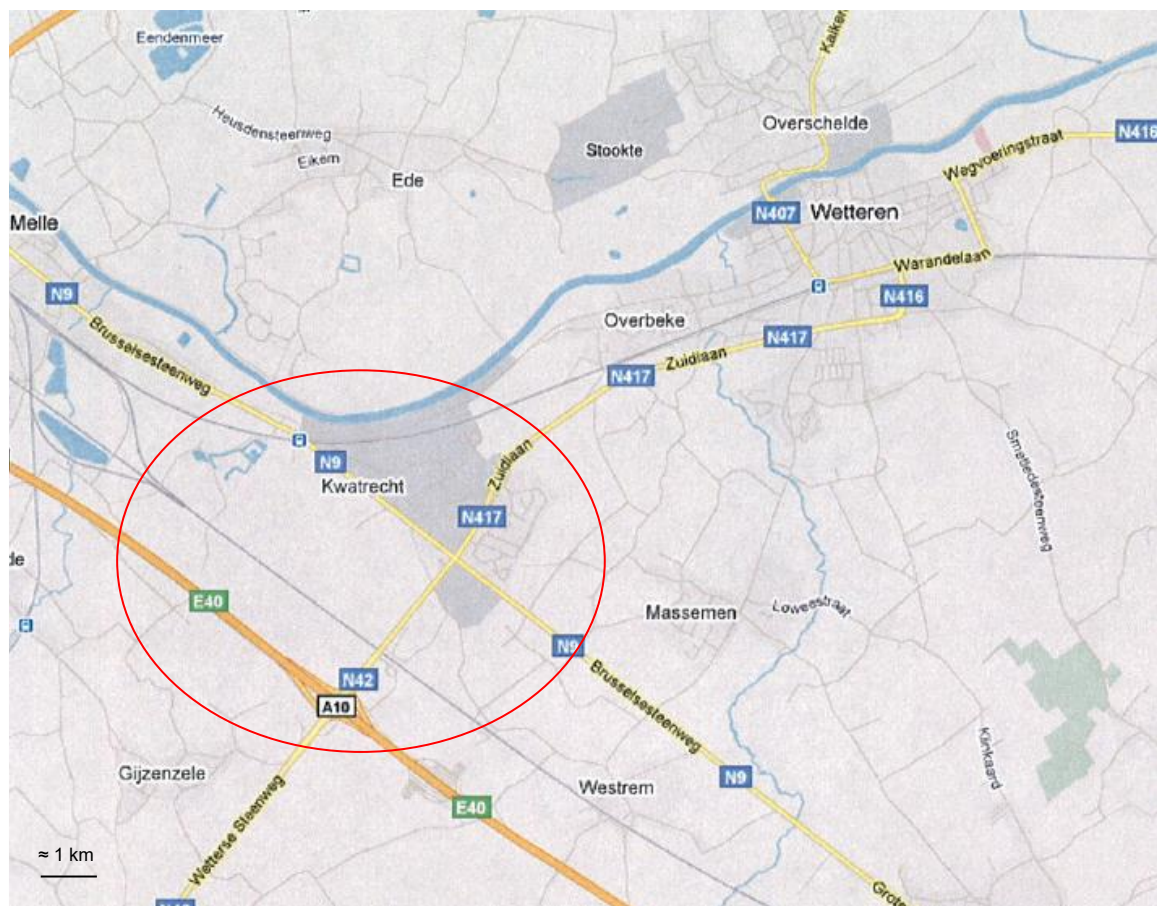


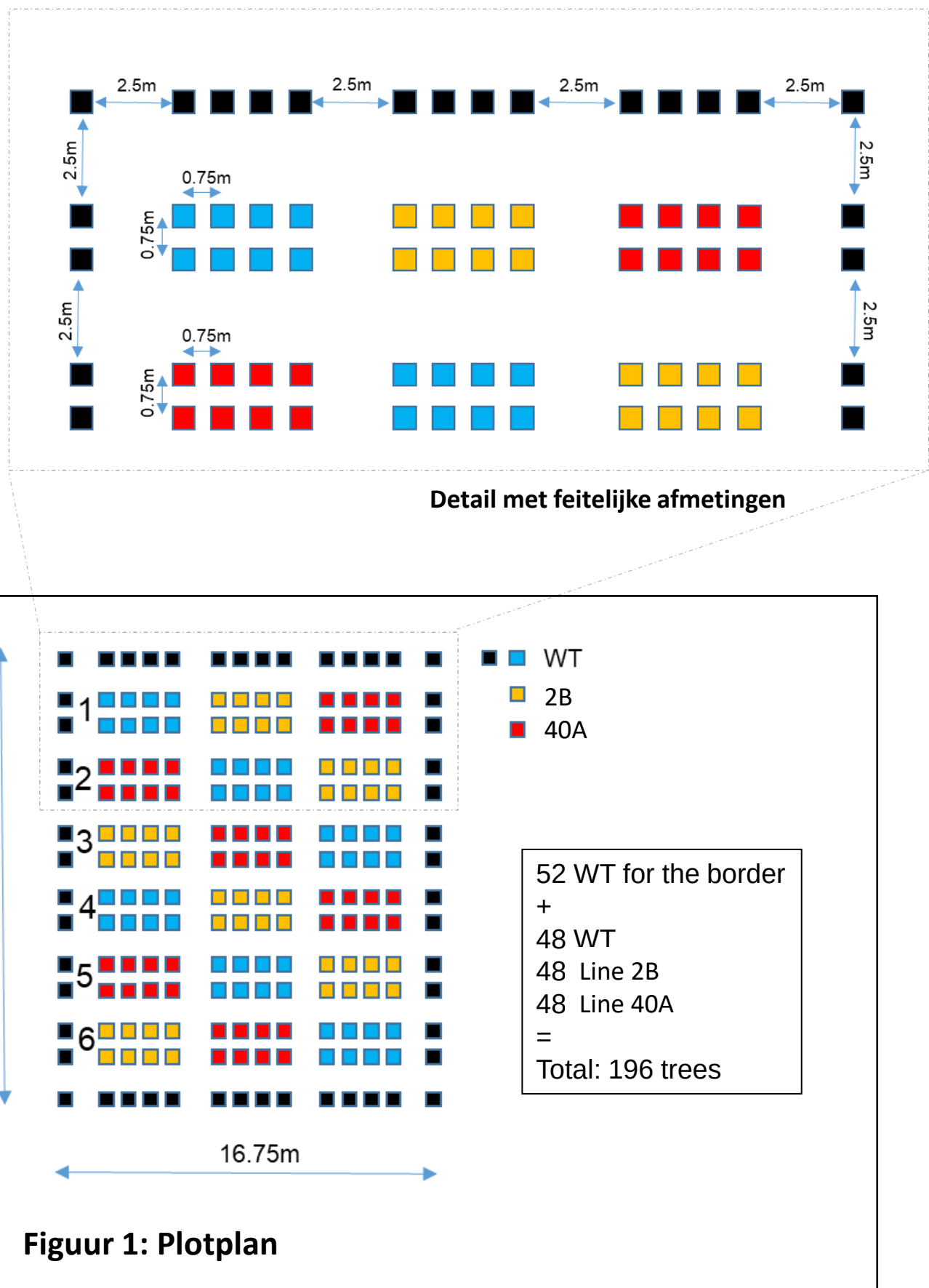
Figure 1: The Biosynthesis pathway of Monolignols, modified after De Vries et al. (2018). Transaldolase 2 is highlighted.

BIJLAGE 4: LIGGINGSPLAN



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

BIJLAGE 5: PLOTPLAN



BIJLAGE 6: PROEFPROTOCOL

1. Verantwoordelijkheden

De rechtspersoon VIB is de verantwoordelijke voor de proef.

2. Logboek

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

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

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

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

In het logboek zullen de volgende gegevens worden genoteerd:

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

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

3. Plantwerkzaamheden

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

4. Bodembedekker

Tussen en rond de bomen zal klaver worden gezaaid om zo de bodem te bedekken en een woekering van onkruid te voorkomen. De klaver laat toe om wortelstekken gemakkelijk te detecteren.

5. Werkzaamheden tijdens de groeiperiode

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

Onkruidbestrijding

Door klaver rond de bomen te zaaien wordt een woekering van onkruid voorkomen. Eventuele onkruidplanten die te groot dreigen te worden zullen manueel en/of door toepassing van herbiciden worden bestreden.

Monitoring

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

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

5. Oogst en vervoer van hout en houtchips

De oogst van de takken wordt ten laatste een week van tevoren gemeld aan de Federale Overheidsdienst Volksgezondheid, Veiligheid van de Voedselketen en Leefmilieu. Oogsten betekent het geheel of gedeeltelijk

oogsten van takken en/of stam + takken van een deel of van alle bomen. Stam en takken zullen nooit ouder dan drie jaar zijn op het moment van de oogst.

Met de geoogste takken en/of stammen kunnen de volgende dingen gebeuren:

Optie 1

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

Optie 2

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

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

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

6. Vernietiging van materiaal dat niet gebruikt wordt

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

7. Volgende teelt

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

8. Afwijkingen

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

9. Activiteitenverslag

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

10. Eindverslag

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

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

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

BIJLAGE 7: MONITORINGSPLAN

Monitoring gedurende de proef

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

Monitoring na afloop van de proef

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

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

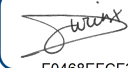
BIJLAGE 8: VERKLARING INZAKE BURGERLIJKE AANSPRAKELIJKHEID

Ondergetekende Christine Durinx, 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: 10 January 2024

Handtekening:

DocuSigned by:

F0468EFCF39A4C9...
Christine Durinx
Managing director, VIB

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

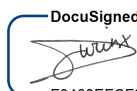
BIJLAGE 9: VERKLARING INZAKE LEVERING VAN CONTROLESTALEN

Ondergetekende Christine Durinx, 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: 10 January 2024

Handtekening:

DocuSigned by:

F0468EFCF39A4C9...

Christine Durinx
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 Tobbacq en Rudy Demotte van 28 november 2005 met referte 53.336/L460/MD.

BIJLAGE 10: Detectie en bepalingstechnieken

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

1. Isolatie van genomisch DNA

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

2. PCR Protocol

2.1. Te gebruiken primers

Sequentie (5' ---> 3')	Target	Annealing Temp (°C)	Lengte van PCR product (bp)
GGTTTCTCTGAGGAGCCAGTA	<i>Ptlf-gen</i>	54.2	71
GCCTCCCATGTCCCTCTTC			
GTAGTGATTGACCGATTCTTGC	<i>hph</i>	59	171
TCCGGAAGTGCTTGACATTGG			

2.2. PCR mix

ALLin™ Red Taq	10 µl
forward primer (10µM)	0.4 µl
reverse primer (10µM)	0.4 µl
Milli-Q water	7.2 µl
Genomic DNA template (4 ng)	2 µl

2.3. PCR-programma:

Stap1	95°C	3 min	
Stap2	95°C	30 sec	
Stap3	Ta	30 sec	(Ta zoals aangegeven in Tabel onder 2.1.)
Stap4	72°C	30 sec	
Stap5	72°C	5 min	
	16°C	∞	

Stap 2 tot 4 33 keer herhalen.

2.4. Gelelectroforese

DNA gelelectroforese van de gegenereerde DNA fragmenten, waarbij in een referentiaantje een DNA ladder wordt toegevoegd. Aanwezigheid van een DNA fragment van 171 bp in het PCR product duidt dan op de aanwezigheid van het hph gen, en dus dat het om transgeen materiaal ging. Het DNA kan zichtbaar gemaakt worden met behulp van verschillende aan DNA bindende kleurstoffen zoals Ethidiumbromide, Sybr Safe of Gel Green.

2.5. Controles

Er moeten voldoende positieve en negatieve controles worden meegenomen. Als negatieve controles kan bijvoorbeeld genomisch DNA worden gebruikt van ouderlijn 717-1B4, of enig andere niet-genetisch gewijzigde populierenlijn. En als positieve controle kunnen gebruikt worden het plasmide pHellsgate-sCAD, en genomisch DNA afkomstig van bijvoorbeeld de genetisch gemodificeerde lijn 2B. Het experiment moet minimaal in duplo worden uitgevoerd.