



Nota van het Secretariaat van de Bioveiligheidsraad ter attentie van de lezers

Het ingesloten publiek dossier is de versie gepubliceerd op het "Belgian Biosafety Server" op 28 januari 2003 onder referentie "03V1N_1.pdf".

Dit dossier wordt gepubliceerd onder voorbehoud van verdere wijzigingen die door de kennisgever zouden moeten geleverd worden.

PUBLIEK DOSSIER
VRIJGEVING VAN TRANSGENE PLANTEN VOOR EXPERIMENTELE DOELEINDEN
(DEEL B)



Fruitteeltcentrum, Katholieke Universiteit Leuven

Veldproef met appelbomen, genetisch gewijzigd voor zelfvruchtbaarheid: bepalen van invloed op productie, vruchtkwaliteit en bloemknopvorming.

B/BE/03/V1

Korte Inleiding:

Het vrijzetten van genetisch gewijzigde organismen (GGO's) in het milieu is strikt gereguleerd op Europees niveau door de richtlijn 2001/18/EC van 12 maart 2001, welke richtlijn 90/220/EEC herroept en op Belgisch niveau door een nieuw Koninklijk Besluit nl. "tot reglementering van doelbewuste introductie in het leefmilieu en/of het in de handel brengen van GGO's of producten die er bevatten" welke het Koninklijk Besluit van 18 December 1998 herroept. De overgangprocedure tussen deze twee besluiten is op dit moment (18 december 2002) nog steeds een lopende zaak.

Om een veilig gebruik van GMO's te waarborgen, stipuleren beide wetteksten ondermeer dat het vrijzetten van GMO's voor experimentele doeleinden verboden is zonder de voorafgaande schriftelijke toelating van de bevoegde minister. Deze beslissing is gebaseerd op een grondige evaluatie van de bioveiligheid van de geplande vrijstelling (risico-evaluatie) en wordt uitgevoerd door de Bioveiligheidsraad, samengesteld uit verschillende Wetenschappelijke Comit es waarin onafhankelijke experts van Belgische universiteiten en gouvernementele instituten zetelen.

Om de benodigde toestemming van de bevoegde Minister te verkrijgen, heeft het onderzoekscentrum **Fruitteeltcentrum, Katholieke Universiteit Leuven (KULeuven)** bij de Federale Overheidsdienst Volksgezondheid, Veiligheid Voedselketen en Leefmilieu een aanvraagdossier ingediend. In overeenstemming van het advies van de Bioveiligheidsraad kan de bevoegde minister aan het onderzoekscentrum **Fruitteeltcentrum, KULeuven** de toestemming verlenen om onderzoek met transgene **appelbomen** uit te voeren in de jaren 2003 – 2006, zoals beschreven in de aanvraag: **B/BE/03/V1**.

De vrijzetting is voorzien op een proefstation in **Vlaanderen**, gelegen op het grondgebied van de stad **Aarschot** en zal het normale groeiseizoen van het gewas **appel** volgen die loopt van **maart** tot **november**.

INHOUDSTAFEL:

p3	INHOUDSTAFEL
p4	ALGEMENE GEGEVENS
p5	Beschrijving van de genetisch gewijzigde plant (GGP)
p5	Aard en doel van de beoogde proefneming
p6	ONDERZOEKS- EN ONTWIKKELINGSACTIVITEITEN
p6	Voorafgaande ontwikkelingsactiviteiten
p6	Kennis en ervaring verkregen in eerdere ontwikkelingsactiviteiten
p6	Toekomstige activiteiten
p7	VOORDELEN
p8	RISICO'S
p9	INPERKINGS-, CONTROLE- EN OPVOLGINGSMAATREGELEN
p9	Controle op stuifmeelverspreiding (biologische vermenging)
p9	Controle op de verspreiding van transgene zaden/vruchten (biologische en fysieke vermenging)
p9	Controle op vrijwilligers (opvolging, monitoring, na-oogst behandeling)
p10	Vernietiging van transgeen materiaal
p10	Opleidingsvereisten
p10	Noodsituaties
p11	ANDERE INPERKINGS-, CONTROLE- EN OPVOLGINGSMAATREGELEN
p11	Verantwoordelijkheden van de kennisgever
p11	Inspectie door de publieke overheden
p11	Activiteitenverslag
p12	REFERENTIES
p13	VERKLARENDE WOORDENLIJST VAN DE GEBRUIKTE TERMEN
p15	CONTACTADRES

ALGEMENE GEGEVENS:

Beschrijving van de genetisch gewijzigde plant (GMP) :

Algemene inleiding: (Voor een lijst van wetenschappelijke termen en begrippen zie de verklarende woordenlijst op p13).

De cultuurappel (*Malus x Domestica* .Borkh.), is een economisch belangrijk fruitgewas in België, waarvan de geteelde productie 9,600 Ha bedraagt. Eén van de problemen waarmee appelteelers niettemin geconfronteerd worden is de hoge jaarlijkse variabiliteit in opbrengst. Zo varieerde bijvoorbeeld de productie in België voor de periode 1990 – 2001 tussen 140.575 en 562.382 miljoen ton per jaar, met opbrengsten per ha schommelend tussen 166,874 Hg/ha en 517,895 Hg/ha (Gegevensafkomstig van de Voedsel en Landbouwdatabase van de Verenigde Naties, <http://apps.fao.org/>). Deze verschillen van jaar tot jaar resulteren in grote inkomstenverschillen voor de teler en bijgevolg zal de prijs voor de consument schommelen. De reden voor deze variaties zijn gedeeltelijk te wijten aan de verschillen in de efficiëntie van kruisbestuiving van de bloemen in de lente. Bij appelbomen wordt er immers enkel fruit gevormd wanneer ze kruisbestoven worden met stuifmeel van een andere compatibele cultivar. Omwille van deze reden bevatten commerciële boomgaarden over het algemeen ongeveer 10% “bestuivings-“bomen. De meest belangrijke factor voor kruisbestuiving is de activiteit van bijen. Het is vanzelfsprekend dat wanneer de weersomstandigheden ongunstig zijn tijdens het bloeiseizoen (regen, koude,...) dat de bijen niet actief zijn, wat resulteert in een zeer geringe mate van kruisbestuiving.

Het principe van zelf-incompatibiliteit:

In ons onderzoek van zelf-incompatibiliteit hebben we de activiteit van het gen dat verantwoordelijk is voor de herkenning (en verwerping) van het eigen stuifmeel, of stuifmeel van een zeer verwante variëteit, bestudeerd. Dit gen is aanwezig in 2 kopijen in alle appelvariëteiten en wordt enkel geactiveerd tijdens de bloei. Het produceert een klein proteïne (S-RNase genaamd), welk de groei van het eigen stuifmeel verhindert wanneer dit op de stempel van de bloem terecht komt. Dit gen wordt het S-gen of zelf-incompatibiliteitsgen genoemd.

We hebben verscheidene van deze S-genen uit verschillende variëteiten van appel geïsoleerd en gekopieerd (gekloneerd) en vervolgens de bladeren van de geteelde appelvariëteit (*Malus x Domestica* .Borkh.) “Elstar” getransformeerd, in één geval met een kopij van dit gen in de tegenovergestelde richting (zgn. “anti-sense”) en in het tweede geval met een extra kopij van het S-gen (zgn. “sense”). In beide gevallen zal dit in de getransformeerde plant een mechanisme op gang brengen dat ervoor zorgt dat de activiteit van het S-gen teniet gedaan wordt. Voor het transformeren maakten we gebruik van de bacterie *Agrobacterium tumefaciens*. Het is immers zo dat *Agrobacterium* onder natuurlijke omstandigheden in staat is om planten te transformeren op de plaats waar ze verwonding of schade opgelopen hebben. Tijdens dit natuurlijk infectieproces brengt de bacterie delen van zijn eigen DNA over naar het DNA van de gastplant op de plaats waar deze infectie gebeurt. De overgebrachte genen zorgen voor de vorming van een tumor in de plant waar de bacterie verder leeft en groeit. Voor de genetische transformatie van planten onder laboratoriumomstandigheden worden enkel de genen van de bacterie die verantwoordelijk zijn voor de overdracht van het DNA behouden en worden de andere genen vervangen door een nieuw gen, wat in ons geval het omgekeerde S-gen of de extra kopij ervan betreft. Naast het S-gen heeft de *Agrobacterium*-bacterie ook een gen overgebracht dat codeert voor het verkrijgen van resistentie tegen het antibioticum kanamycine. Dit “selectiegen” laat ons toe om deze cellen en planten te herkennen en te selecteren welke het omgekeerde S-gen/extra S-gen bevatten. Bijgevolg kunnen we stellen dat een getransformeerde plant een plant is die op een specifieke wijze aangepast is met 1 of meer genen, welke onder normale omstandigheden niet aanwezig zouden zijn. Dit verschilt duidelijk van planten welke door seksuele vermeerdering ontstaan, omdat tijdens dit proces grote hoeveelheden DNA, met alle genen van de 2 ouderplanten herschikt worden op een willekeurige manier.

Aard en doel van de beoogde proefneming:

De verkregen transgene bomen werden reeds enkele jaren bestudeerd onder gecontroleerde serre-omstandigheden, waarbij aangetoond werd dat ze ofwel volledig, ofwel gedeeltelijk zelfbevruchtend zijn. De bedoeling van deze voorgestelde veldproef is het nagaan of een appelboom die zichzelf kan bevruchten een normale opbrengst kan geven en of er effecten zijn op vruchtkwaliteit en bloemvorming onder normale teeltomstandigheden op het veld. Het is duidelijk dat de weersomstandigheden buiten meer variabel zullen zijn dan in de serre. Door het specifiek blokkeren van slechts 1 genactiviteit (van het S-gen) kunnen we nu op directe wijze vergelijkingen maken tussen gewone en zelfbevruchtende “Elstar” en een correcte meting uitvoeren van het effect dat de weersconditie (regen, wind, koude,...) heeft op de vruchtzetting, totale opbrengsten, de kwaliteit van de oogst en andere belangrijke landbouwkundige parameters. Indien blijkt dat het kenmerk van zelfbevruchting leidt tot een verbetering van opbrengsten en kwaliteit, dan betekent dit dat we kunnen overgaan tot het introduceren van dit kenmerk in nieuwe variëteiten door middel van traditionele veredelings technieken. Het is dus zeer belangrijk om op te merken dat het geenszins de bedoeling is om commerciële, transgene appelbomen te ontwikkelen op basis van deze studie.

De transgene planten die we willen gebruiken in deze studie werden geënt op niet-transgene onderstammen zoals normaal gebeurt bij commerciële appel variëteiten. Deze planten zijn bovendien op fysiologisch en ontwikkelingsvlak identiek aan de niet-getransformeerde “Elstar” bomen waarvan zij afgeleid zijn.

Daarnaast is het belangrijk om te benadrukken dat deze proef enkel wetenschappelijke doeleinden heeft en dat alle materiaal geproduceerd tijdens het verloop ervan (zoals snoeihout, fruit, zaden,...) ter plaatse op het proefveld vernietigd zal worden.

ONDERZOEKS- EN ONTWIKKELINGSACTIVITEITEN

Voorafgaande ontwikkelingsactiviteiten

Het veredelen van appelvariëteiten is een lange-termijn proces. Het experimentele werk van deze veldproef werd opgestart in het midden van de jaren 90, wanneer verschillende varianten (allelen) van het S-gen van appel geïdentificeerd werden en hun DNA-sequentie bepaald werd (Broothaerts et al., 1995; Janssens et al., 1995; Van Nerum et al., 2001; Verdoodt et al., 1998). Na de identificatie van de verscheidene S-allelen, werd de appelcultivar “Elstar” getransformeerd met constructen van 1 van de 2 S-allelen, die onder natuurlijke omstandigheden in “Elstar” aangetroffen worden- op een dusdanige manier dat de activiteit van het gen onderdrukt wordt (Janssens, 1997). Van de 1500 transformatie-experimenten die met Elstar-bladeren uitgevoerd werden, werden 46 getransformeerde scheuten verkregen. Vanuit deze transgene scheuten werden planten gemaakt en grondig bestudeerd onder *in vitro*-omstandigheden in het laboratorium. Op basis van deze resultaten werden enkele lijnen geselecteerd om verder vermeerderd te worden en overgebracht naar de serre waar ze geënt werden op een niet-transgene, commerciële onderstam. Deze bomen werden vervolgens verder opgegroeid en bestudeerd onder gecontroleerde condities. De bomen in de serre vertoonden hun eerste bloeiperiode in de lente van 1999 en gedurende de daaropvolgende jaren was het mogelijk om gecontroleerde bestuivingen van de bloemen uit te voeren om de graad van zelfbevruchting van deze planten te kunnen bepalen.

Kennis en ervaring verkregen in eerdere ontwikkelingsactiviteiten

De analyse van de fruit- en zaadproductie van de transgene lijnen gedurende de laatste 3 jaren heeft duidelijk aangetoond dat de transgene lijnen variëren van volledige zelf-compatibiliteit (zelf-fertiliteit) tot een gedeeltelijke zelf-compatibiliteit. Dit werd eveneens aangetoond door het feit dat de groei van de pollenbuis van 'self-pollen' in de stijl van de stamper niet langer geïnhibeerd wordt en het feit dat het eiwit gevormd door het S-gen niet meer aanwezig is in de stamper, of slechts in veel mindere mate aanwezig is. Bovendien bleek de transformatie van de plant ook stabiel gebeurd te zijn, aangezien de graad van zelf-compatibiliteit constant blijft gedurende deze periode. Uiteindelijk werden er 6 transgene lijnen geselecteerd om te testen onder veldcondities en hiervoor werden kopijen (klonen) van deze lijnen aangemaakt door het enten op een onderstam. Deze 6 lijnen werden grondig onderzocht op DNA-niveau (i.c. de suppressie van de S-genexpressie werd nagegaan in verschillende weefsels met inbegrip van de stampers), op biochemisch niveau (het meten van de hoeveelheid eiwit geproduceerd door het S-gen) en op fysiologisch niveau (meten van fruitproductie, bloemvorming, vruchtkwaliteit na zelf- of kruisbestuiving)

Toekomstige activiteiten:

Nu dat de transgene planten reeds grondig gekarakteriseerd werden in het laboratorium en de serre, willen we nagaan of zelf-fertiele planten een specifiek voordeel kunnen bieden voor de fruitteler. Alhoewel het lijkt dat zelfbestuiving een specifiek voordeel kan bieden, zou het kunnen zijn dat dit toch resulteert in een te overmatige productie van fruit wat kan resulteren in een vermindering van de vruchtzet of dat het verwijderen van vruchten nodig blijkt te zijn.

Indien, zoals we hopen, de zelf-compatibele “Elstar” bomen beter presteren dan niet-getransformeerde “Elstar” bomen dan kunnen we de mogelijkheden nagaan om dit kenmerk te introduceren in de nieuwe appelvariëteiten welke we ontwikkelen door middel van klassieke veredelings technieken. Het is namelijk zo dat er in de natuur verschillende zelf-compatibele appelvariëteiten voorkomen, welke dan gebruikt kunnen worden als ouders in toekomstige kruisingsexperimenten.

VOORDELEN

Zoals reeds vermeld zijn er reeds enkele zelf-fertiele appelvariëteiten beschikbaar. Het is echter in regel zo dat ongeveer alle commercieel geteelde appels zelf-incompatibel zijn. Dat betekent bijgevolg dat deze wanneer ze in monocultuur geteeld worden er eveneens speciale bestuivingsbomen geplant moeten worden om een goede kruisbestuiving en fruitproductie te kunnen garanderen. Daarenboven kunnen de weercondities op het moment van de bloei een dramatisch effect op de efficiëntie van de kruisbestuiving uitoefenen, aangezien onder koude, natte en winderige condities veel minder kruisbestuiving plaatsvindt met als gevolg een vermindering van de opbrengst. Dit komt doordat kruisbestuiving hoofdzakelijk afhankelijk is van de activiteit van bijen, welke onder slechte weersomstandigheden in hun nest blijven. Daarom hebben zelfbevruchtende (zelf-compatibele) variëteiten het potentieel om de jaarlijkse variaties in de opbrengsten (en inkomens van de fruittelers) te verminderen en te garanderen dat er fruitproductie mogelijk is onder slechte weersomstandigheden door de behoefte aan kruisbestuiving voor fruitproductie te elimineren. Het is vanzelfsprekend dat wanneer er toch kruisbestuiving zou optreden, dit geen effect heeft op de productie of de vrucht. Voor de fruitteler betekent dit eveneens dat een additionele 10% van boomgaardruimte, welke normaal voorzien is voor de bestuivingsbomen, vrijkomt. Voor de consument betekent dit dat productie, kwaliteit en eindprijzen meer voorspelbaar en regelmatiger worden. Tijdens de periode 1990-2000 varieerde de appelproductie in België en Luxemburg met een factor 5 op basis van de gegevens vrijgegeven door de Voedsel- en Landbouworganisatie van de Verenigde Naties (zie <http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture>).

Alhoewel zowel zelf-compatibele als parthenocarpische (vruchtzetting zonder zaadvorming) appelvariëteiten gekend zijn, kunnen we niet simpelweg dergelijke zelf-compatibelen vergelijken met de zelf-incompatibele variëteiten omdat de totale opbrengsten en kwaliteit ook afhankelijk zijn van andere variëteit-eigenschappen. De grote genetische verschillen tussen appelvariëteiten indiceren dat de enige correcte manier om duidelijke antwoorden hieromtrent te verkrijgen via de transgene aanpak is. Hier wordt immers slecht 1 karakteristiek van “Elstar”, nl. het bestuivingsgedrag, veranderd.

RISICO'S

Het is niet de bedoeling om transgene, zelfcompatibele appelbomen voor commercieel gebruik te ontwikkelen, maar de enige bedoeling is om de impact van zelf-compatibiliteit te beschrijven bij bomen in het veld gedurende de periode van 4 opeenvolgende jaren.

De risico's verbonden met de teelt van de transgene planten zijn gebaseerd op 2 belangrijke aspecten. In eerste instantie gaat het om de toxiciteit van de genen die geïntroduceerd werden en in tweede instantie het risico voor het milieu bij de mogelijke ongecontroleerde verspreiding van transgene planten of stuifmeel en zaden.

Gentoxiciteit: In de bomen, te bestuderen in deze veldproef, hebben we de genactiviteit van een welbepaald gen (het S-gen) onderdrukt. Dit gen is normaal gezien aanwezig in de normale "Elstar" appelboom en komt enkel tot expressie tijdens de bloei. Dit gen is enkel betrokken bij de mechanismen van het afstoten van eigen stuifmeel. De transgene planten kunnen daarom geen enkel direct toxisch effect hebben voor mogelijke gebruikers. De transgene lijnen bevatten daarnaast een tweede merker/selectie gen welke de antibiotica kanamycine en neomycine detoxifieert. Dit gen (*nptII*) werd gebruikt als een merker tijdens de transformatieprocedure om planten welke succesvol getransformeerd werden te identificeren en te selecteren. De aanwezigheid of het gebruik van het *nptII*-gen als een selectiemerker in GGO's is reeds vaak het onderwerp geweest van publieke debatten. Op dit moment is er echter nog geen enkel degelijk wetenschappelijk bewijs dat aantoont dat de aanwezigheid van dit gen in het milieu leidt tot enige toxische nevenverschijnselen in mensen, dieren of planten. Een aantal van genetisch gemodificeerde planten welke het *nptII*-gen bevatten werden bovendien reeds goedgekeurd voor vrijgeving in het milieu (http://biosafety.ihe.be/ARGMO/GMO_Plants.html), (<http://www.whybiotech.com/index.asp?trackid=7&id=1726#1726>). Daarenboven is het in feite zo dat het *nptII*-gen in de natuur reeds in sterke mate verspreid is en teruggevonden wordt in een aantal gram-negatieve bacteriën die van nature uit aanwezig zijn in de bodem en de spijsvertering van dierlijke wezens.

Verspreiding van het transgen: Het grootste risico is verbonden aan de mogelijke ongecontroleerde verspreiding van transgeen stuifmeel op de plaats van de veldproef, waardoor het vervolgens zou kunnen kruisbestuiven met andere appelvariëteiten die in de nabije omgeving groeien. Een appelboom kan enkel kruisen met andere appelsoorten en met kweeper (*Cydonia*). Indien dit zou gebeuren, betekent dit dat deze transgene "ontsnapping" gedeeltelijk of volledig zelf-compatibel zou kunnen worden indien blijkt dat deze dezelfde S-allelen als "Elstar" bevat. Eens de transgene "ontsnapping" volwassen is (ongeveer 5-7 jaren oud) geworden kan deze in staat zijn om fruit te produceren door zelfbestuiving indien er geen bestuivingsbomen in de buurt zouden staan. Het is evenwel zo dat nakomelingen van zelfbestuiving in appel gekarakteriseerd wordt door een "inteeltdepressie" wat resulteert in planten die slecht groeien en vaak niet vruchtbaar zijn. Daarom kunnen we stellen dat planten die dit ongecontroleerd verspreide transgen zouden bevatten eigenlijk een selectief nadeel met zich meedragen! De aanwezigheid van het antibiotica-resistentiegen veroorzaakt geen risico voor het milieu (aangezien het aanwezig is in bacteriën in de bodem en het spijsverteringsstelsel van dierlijke wezens) en biedt geen voordeel voor de overlevingskansen van de plant.

De maatregelen om te garanderen dat geen ongecontroleerde stuifmeelverspreiding gebeurt, worden gedetailleerd uitgelegd in de volgende paragrafen.

Wij concluderen dat er geen risico's zijn noch voor het milieu, noch voor de mens.

INPERKINGS-, CONTROLE- EN OPVOLGINGSMAATREGELEN

Controle op stuifmeelverspreiding (biologische vermenging)

De meest belangrijke bron van kruisbestuiving bij appelbomen is de activiteit van bijen (in veel commerciële boomgaarden worden dan ook bijenkorven geplaatst). Onze eigen studies geven aan dat wind-gemedieerde kruisbestuiving verantwoordelijk is voor niet meer dan 10% van de vruchtzetting in de onmiddellijke omgeving van de bestuiver (Porta, 1996). Het is verder essentieel voor het wetenschappelijke succes van dit experiment dat er geen vermenging met vreemd stuifmeel optreedt. Onder veldomstandigheden hebben studies aangetoond dat weinig tot geen appelstuifmeel aangetroffen wordt verder dan 20-30m van de bron van het stuifmeel. De aanbevolen afstand van kruisbestuivende bomen onderling in een boomgaard om een efficiënte bestuiving te verkrijgen bedraagt 5-10m (Wertheim, 1991; Williams and Smith, 1967; Wertheim, 1968). Daarom is de volledige veldproef gesitueerd op een minimum afstand van 100m van de meest dichtbijgelegen kruis-compatibele variëteit. Appel kan tevens enkel kruisbestuiven met andere *Malus* soorten en kweepeer (*Cydonia*).

De bomen zullen groeien in 2 tunnels, direct naast elkaar gelegen. Elke tunnel is 46m lang en ongeveer 4m hoog en zal 2 rijen van bomen op 3m afstand bevatten. Elke tunnel wordt beschermd aan de zijkanten en uiteinden met plastic tot op 1.8m hoogte. Eén uiteinde zal ook een afsluitbare deur bevatten. De plaats met de 2 tunnels zal omringd worden met een 4m hoog windscherm, geplaatst op 2.5m afstand van de zijkanten van de tunnels en 6m van de uiteinden ervan (ruimte nodig voor een tractor). Dit windscherm zal de windsnelheid voor ongeveer 70% breken. De tunnels zullen het hele jaar door bedekt worden met netten om alle mogelijke insecten die voor enige bestuiving kunnen zorgen buiten te sluiten. 1 week voor de bloeiperiode (dit wordt geschat op basis van de ontwikkelingsstadia van de bloemen) zullen de tunnels met een bijkomend net bedekt worden (maasgrootte van 0.15 x 0.35mm) om het ontsnappen/binnenkomen van stuifmeel te voorkomen. Dit zal hierop blijven tot 1 week na de bloeiperiode (in totaal betekent dit dat het net 5 weken op zijn plaats blijft). De testen welke door het Fruitteeltcentrum eerder uitgevoerd werden (Porta, 1996), hebben aangetoond dat wanneer bomen waar de bron van stuifmeel zich op een afstand van 5m van de bestudeerde bomen bevond, bedekt met deze netten maximaal 10% vruchtzetting vertonen in vergelijking met bomen die door de wind of insecten bestoven werden. Door bijkomende windschermen te plaatsen hebben we er het volste vertrouwen in dat er geen vermenging van stuifmeel kan optreden.

Onder bepaalde omstandigheden (bv. als respons op een periode van droogte of warm weer) is het mogelijk dat de bomen een tweede periode van bloei, later op het jaar, kunnen vertonen. Op wekelijkse basis zullen de bomen hierop gecontroleerd worden voor deze mogelijkheid en onder weerscondities welke dit fenomeen bevorderen. Dit gebeurt dan op meerdere momenten in de week. Alle secundaire bloemknoppen zullen manueel verwijderd worden op het “rozeknop” stadium, waarna ze verzameld en vernietigd zullen worden.

Controle op de verspreiding van transgene zaden/vruchten (biologische en fysische vermenging)

De netten welke de tunnels zullen bedekken dienen om kleine dieren zoals vogels buiten te houden, welke anders appels (en zaden) kunnen verwijderen van het proefveld. Als onderdeel van de wetenschappelijke metingen, zal al het fruit dat op de proefplaats geproduceerd wordt, geteld en gemeten worden op grootte, aantal zaden, positie, enz.. Al het fruit dat niet nodig is voor wetenschappelijke doeleinden wordt met de hand verzameld en alle zaadjes aanwezig in het fruit wordt verwijderd en vernietigd door onder te dompelen in zwavelzuur. Het resterende vruchtvlees zal gecomposteerd worden. Deze behandelingen zullen uitgevoerd worden in overeenstemming met de richtlijnen vastgelegd in overleg met de SBB (<http://biosafety.ihe.be/>) en OVAM (<http://www.ovam.be/>).

Controle op vrijwilligers (opvolging, monitoring, na-oogstbehandelingen)

Het proefveld is gelegen op gronden in eigendom van en beheerd door de K.U. Leuven. Het volledige proefstation is omheind met een afsluiting. Door het proefveld hier te situeren kan het onder de supervisie van het personeel en de stationsmanager gehouden worden. De toegang tot het proefveld zelf is beperkt tot personeel dat direct betrokken is bij het project en de controlerende autoriteiten. Alle bezoekers en behandelingen (sproeien, ziektebeheer, enz.) worden ter plaatse genoteerd in een logboek en dit gebeurt onder toezicht van de stationsmanager.

Op het einde van de proefperiode zullen alle bomen verwijderd en ter plaatse vernietigd worden door verhakseling en compostering. De bomen werden geënt op een niet-transgene onderstam zodat het niet nodig is om de grond te controleren op transgene wortels. Het gebied zal opgevolgd worden gedurende 2 jaren om toevallige zaailingen te voorkomen. Bovendien wordt het DNA van een willekeurige selectie van appelzaden (ongeveer 100) van de meest nabijgelegen gebieden tov het proefgebied jaarlijks opgevolgd voor de aanwezigheid van transgenen.

Vernietiging van transgeen materiaal

Al het transgene materiaal afkomstig van het proefveld zal verzameld en vernietigd worden. Snoeihout zal verhakseld en ofwel gecomposteerd ofwel verbrand worden. Al het fruit zal gecomposteerd worden, en dit gebeurt na het verwijderen van de zaden welke in zwavelzuur gedompeld zullen worden om kieming te voorkomen. Gevallen bladeren worden verzameld op het einde van het seizoen en zullen verbrand of gecomposteerd worden.

Eens de veldproef beëindigd zal zijn, worden de bomen verwijderd en op hun beurt verhakseld en gecomposteerd. De bomen werden geënt op een commerciële (niet-transgene) onderstam. Dit betekent dat er geen speciale maatregelen voor deze onderstammen vereist zijn.

Het is zeer belangrijk te benadrukken dat deze veldproef enkel voor wetenschappelijke doeleinden uitgevoerd wordt. Het is niet de bedoeling om enig fruit voor zaad- of voedseldoeleinden te gebruiken. De maatregelen genomen om het materiaal te vernietigen zijn standaardprocedures om transgeen materiaal te behandelen en moeten niet geïnterpreteerd worden als gerelateerd tot een mogelijke toxiciteit van de planten, aangezien deze op dit vlak volledig identiek zijn aan niet-transgene appels.

Opleidingsvereisten

Er zijn geen speciale opleidingsvereisten nodig voor het personeel in deze veldproef. Afgezien van het overnetten en afschermen met een windscherm, zullen de bomen op exact dezelfde wijze behandeld worden als ander, niet-transgene bomen in een commerciële boomgaard. Dit behelst bijvoorbeeld een geïntegreerd ziektebeheerschema om de ontwikkeling en verspreiding van ziektekiemen (appelschurft en meeldauw) te voorkomen, irrigatie en snoeien. Het beheersteam heeft bijkomend ervaring in het hanteren van transgene bomen onder serre-omstandigheden.

Noodsituaties

Zodra er zich enige tegenindicaties op het gebied van de gezondheid of het milieu zouden voordoen, zal de proef onmiddellijk stopgezet worden. De aangewezen instanties zullen onmiddellijk op de hoogte gebracht worden om verdere inspecties uit te voeren. Indien nodig, zal al het plantenmateriaal ter plekke verzameld en vernietigd worden.

ANDERE INPERKINGS-, CONTROLE- EN OPVOLGINGSMAATREGELEN:

Verantwoordelijkheden van de kennisgever:

De licentie welke aan de kennisgever door de bevoegde minister gegeven kan worden omschrijft dat de kennisgever volledige burgerlijke aansprakelijkheid heeft wat betreft de mogelijke schade die kan optreden door de vrijgeving aan de menselijke en dierlijke gezondheid, alsmede aan het milieu.

Inspectie door de publieke overheden:

In België heeft de Federale Overheidsdienst Volksgezondheid, Veiligheid Voedselketen en Leefmilieu de leiding over de controle van de aangevraagde veldproeven met transgene planten. De belangrijkste taken van de inspecteurs met betrekking tot deze veldproeven is te controleren of ze uitgevoerd worden volgens de condities welke vooropgesteld werden in de licentie en de specifieke protocols voor het opgroeien van genetisch gemodificeerde teelten en om de mogelijkheid na te gaan van inbreuken op de toegestane licentie. Hiervoor worden tijdens de inspectierondes controlelijsten gebruikt. Om deze inspectierondes mogelijk te maken is de kennisgever bijgevolg verplicht om de exacte locaties van de aangevraagde proeven aan te geven en om de bevoegde autoriteit op voorhand op de hoogte te stellen over de zaai- en oogstdatum. Daarnaast nemen de inspecteurs stalen van het plantmateriaal welke geanalyseerd worden in officiële laboratoria. Na de oogst, zal de veldproef gecontroleerd worden op potentiële wildgroeiers. In de gevallen waar een verkeerd management of fraude vastgesteld wordt zullen specifieke sancties geheven worden.

Activiteitenverslag:

Op het einde van het groeiseizoen wordt er een activiteitenverslag voorbereid door de kennisgever dat aan de bevoegde autoriteit, i.c. de Federale Overheidsdienst Volksgezondheid, Veiligheid Voedselketen en Leefmilieu, afgeleverd moet worden vóór het einde van het jaar. Dit activiteitenverslag moet op zijn minst de volgende gegevens bevatten:

- Een kopie van het logboek
- De precieze plaats en periode van de vrijgeving
- De precieze aard van de vrijgegeven transformanten
- De eigenlijke oppervlakte van de plaats van de veldproef
- De doelstelling(en) van de veldproef
- De frequentie en de aard van de observaties op de plaats van de veldproef
- De maatregelen welke getroffen werden om te voorkomen dat er een ongewenste vrijstelling van transgeen materiaal buiten de plaats van de veldproef plaatsvindt
- De gebruikte methode voor het vernietigen van de oogst en de doeltreffendheid hiervan
- De resultaten welke tijdens het uitvoeren van de proef verkregen werden
- Een overzicht van de bewaking van de plaats van de veldproef

REFERENTIES

- Broothaerts, W.; Janssens, G. A.; Proost, P.; Broekaert, W. F. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant mol biol* **1995**, *27*, 499-511.
- Janssens, G. Molecular analysis of the self-incompatibility (S-) gene in apple (*Malus x domestica* Borkh.); S-genotyping of apple cultivars and (anti)sense suppression of the S-gene, K.U.Leuven, 1997.
- Janssens, G. A.; Goderis, I. J.; Broekaert, W. F.; Broothaerts, W. A molecular method for S-allele identification in apple based on allele-specific PCR. *Theoretical and Applied Genetics* **1995**, *91*, 691-698.
- Porta, L. Zelf- en kruisbestuiving bij appel cv Jonagold en implicaties voor vruchtzetting en vruchtkwaliteit. Eindverhandeling voorgedragen tot het behalen van de graad van Bio-Ingenieur Landbouwkunde, K. U. Leuven, 1996.
- Van Nerum, I.; Geerts, M.; Van Haute, A.; Keulemans, J.; Broothaerts, W. Re-examination of the self-incompatibility genotype of apple cultivars containing putative 'new' S-alleles. *Theoretical and Applied Genetics* **2001**, *103*, 584-591.
- Verdoodt, L.; Van, H. A.; Goderis, I. J.; De, W. K.; Keulemans, J.; Broothaerts, W. Use of the multi-allelic self-incompatibility gene in apple to assess homozygosity in shoots obtained through haploid induction. *Theoretical and Applied Genetics* **1998**, *96*, 294-300.
- Wertheim, S. J. Nieuwe inzichten in de bestuiving van appel en peer. *Meded. Dir. Tuinbouw* **1968**, *31*, 438-447.
- Wertheim, S. J. *Malus* cv. Baskatong as an indicator of pollen spread in intensive apple orchards. *J Hort Sci* **1991**, *66*, 635-642.
- Williams, D. R.; Smith, B. D. VII. Observations on factors influencing the effective distance of pollinator trees in 1966. *Ann. Rep. Long Ashton Agr. Hort, Res. Stn. for 1966* **1967**, 126-134.

VERKLARENDE WOORDENLIJST VAN DE GEBRUIKTE TERMEN

Agrobacterium tumefaciens: deze die een ziekteverwekker is bij planten, beschikt over de mogelijkheid om een stukje van haar eigen erfelijke informatie in te bouwen in het planten-DNA. Door deze bacterie ditzelfde te laten doen met het DNA dat we willen inbouwen in een plant, is genetische transformatie bij planten mogelijk.

Allele: één of meerdere verschillende vormen van een bepaald gen welk gelegen is op hetzelfde gedeelte van een bepaald chromosoom.

Antibiotica: letterlijk: tegen wat leeft. De eerste antibiotica werden ontwikkeld uit schimmels (bv. penicilline, streptomycine). Het zijn stoffen die bacteriën doden en zodoende als medicijn worden gebruikt. Bij genetische transformatie van planten worden antibiotica soms gebruikt om een onderscheid te maken tussen getransformeerde cellen (bezitten een antibioticumresistentiegen en overleven het toevoegen van het overeenkomstige antibioticum) en niet-getransformeerde cellen (bezitten geen resistentiegen en worden gedood door aanwezige antibiotica).

Antisense: antisense RNA (of DNA) is een enkele streng nucleïnezuren (RNA of DNA) complementair met een coderend mRNA (sense). De complementaire strengen binden met elkaar, waardoor de werking van het mRNA geblokkeerd wordt en er geen eiwitten meer worden gevormd.

Bacteriën: ééncellige micro-organismen; slechts een klein deel van deze organismen is ziekteverwekkend.

Biotechnologie: de toepassing van biologische mechanismen in productieprocessen. Meer specifiek is de biotechnologie een multidisciplinaire wetenschap en technologie, die vooral steunt op de in-vitrocultuur en op gerichte genetische modificatie van microbiële plantaardige of dierlijke systemen, met het oog op het verkrijgen van nuttige producten of effecten.

Chromosoom: kort staafje bestaande uit eiwitten en zeer dicht op elkaar gewonden DNA.

DNA: DNA: ‘desoxyribonucleïnezuur’, een scheikundige stof die de drager is van de erfelijke informatie. DNA bestaat uit twee strengen die elkaars spiegelbeeld zijn. Het DNA is voornamelijk aanwezig in elke celkern.

Gen: genen zijn niet enkel bedoeld om aan nakomelingen door te geven, ze zijn ook de handleiding van elk organisme. Een gen of meerdere genen samen dragen de informatie van een erfelijk kenmerk, een gen zorgt voor de bouw van een bepaald eiwit en vertelt zo aan de cellen wat ze in bepaalde omstandigheden moeten doen..

Genetica: tak van de biologie die de erfelijke biologische kenmerken van de levende organismen en de wijze waarop ze worden overgedragen, bestudeert.

Genetic engineering: algemene term voor het gebruik van recombinant-DNA-technieken.

Genetische informatie: informatie over een bepaald erfelijk kenmerk, dat vervat ligt in de moleculaire structuur van de genen; aan de hand van deze informatie kunnen de genen de eiwitsynthese sturen.

Genetische modificatie: de gerichte wijziging van de structuur van één of meer genen in een levend organisme met behulp van technieken van de moleculaire biologie.

Genexpressie: de mate van het tot uiting komen van de genetische informatie.

Genoom: het geheel van de genen in een organisme.

GMO of GGO: genetisch gemodificeerd organisme, een organisme waarvan de structuur van één of meerdere genen gewijzigd is door de techniek van genetische modificatie (zie genetische modificatie).

Hybride: bij planten is een hybride voornamelijk een combinatie van inteeltlijnen waarvan het heterosis-effect wordt geëxploiteerd (hiermee bedoelt men dat de combinatie van twee inteeltlijnen opbrengstverhogend werkt).

In-vitro: betekent letterlijk 'in glas', en slaat op het kweken van organismen of cellen in proefbuizen en ander glaswerk op een steriele manier.

In vivo: een levend systeem (tegenstellend gebruikt t.o.v. in-vitro).

Klonen: het doen ontstaan van een organisme of cel, uit een levend organisme of een cel, met identieke genetische informatie.

Moleculaire biologie: tak van de biologie die het metabolisme in de organismen op moleculaire schaal bestudeert.

Proteïne: ander woord voor eiwit, een stof die uit basiselementen (aminozuren) opgebouwd is en die instaat voor het vervullen van de functies in de levende cel. De genen bepalen rechtstreeks de structuur van de eiwitten. Elk gen codeert voor een eiwit.

Plasmide: een stukje DNA dat in een cel afzonderlijk kan bestaan en zichzelf kan vermenigvuldigen. Plasmiden komen voor in micro-organismen. Het plasmide van *Agrobacterium tumefaciens* wordt gebruikt bij de genetische modificatie van planten.

Resistent: niet vatbaar voor bepaalde ziekten, insecten, ...

Transgeen organisme (zie *GMO*)

Vector: DNA-segment dat toelaat andere DNA-fragmenten te klonen. Een plasmide kan een vector zijn.

CONTACTADRES

Indien U enige reacties heeft op het publiek dossier of op onze activiteiten of indien U wenst bijkomende informatie te verkrijgen over dit publiek dossier, gelieve ons te contacteren op het volgende adres:

Kennisgever

Naam van het onderzoekscentrum: Fruitteeltcentrum, Katholieke Universiteit Leuven

Adres: Willem de Croylaan 42, 3001 Heverlee

Telefoonnummer: 016 – 32 24 46

Fax: 016 – 32 29 66

Website: <http://www.agr.kuleuven.ac.be/dtp/fruit/fruhomen.htm>

Contactpersoon

Naam: Luc WEST

Adres: Dienst Communicatie K.U.Leuven, Oude Markt 13, B-3000 Leuven

Telefoonnummer: 016 – 32 37 12

Fax:

E-mail: persdienst@kuleuven.be