

KENNISGEVING GGO-VELDPROEFAANVRAAG

Technisch dossier

A. ALGEMENE INFORMATIE

A1. Kennisgever

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

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

Verantwoordelijke wetenschapper:

dr. Wout Boerjan
VIB-UGent
Centrum voor Plantensysteembioogie
Technologiepark 71
9052 ZWIJNAARDE

Kwalificaties: doctor in de wetenschappen.

Ervaring: 30 jaar ervaring in de plantenbiotechnologie, al eerder betrokken geweest bij de veldproeven B/BE/07/V2, B/BE/13/V1, en B/BE/21/V1 met genetisch gewijzigde populieren.

Bioveiligheidscoördinator:

René Custers, MSc
VIB
Rijvisschestraat 120
9052 zWIJNAARDE

Kwalificaties: Msc in moleculaire wetenschappen

Ervaring: meer dan 25 jaar ervaring in bioveiligheid, zowel wat betreft ingeperkt gebruik als introductie in het leefmilieu. Plaatsvervangend lid van de Adviesraad voor Bioveiligheid.

A3. Titel van het project

Wetenschappelijk veldonderzoek naar maïs met verbeterde verteerbaarheid.

B. INFORMATIE OVER DE RECIPIËNTEN

B1. Volledige naam

- a) familie: *Poaceae*
- b) genus: *Zea*, sectie *Zea*
- c) species: *Zea mays*
- d) subspecies: *mays*
- e) cultivar/teeltlijn: inteeltlijn B104
- f) gangbare naam: maïs

B2. Informatie over de voortplanting

B2a) Voortplanting en generatietijd

i) Wijze(n) van voortplanting:

Maïs is een allogame plant die zich generatief voortplant door middel van zaden. De plant heeft een mannelijke bloeiwijze in de vorm van een pluim. De vrouwelijke bloeiwijzen bevinden zich op de aren (kolf). Maïs is voornamelijk kruisbevruchtend en de bestuiving vindt plaats met behulp van de wind, al kan insectbestuiving niet geheel worden uitgesloten. Maïs kent geen asexuele voortplanting (OECD, 2003).

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

Maïszaden kennen geen kiemrust waardoor ze alleen bij bepaalde klimaatomstandigheden kunnen overleven. Maïs is vorstgevoelig en zal daarom de winter in het algemeen niet overleven. Maïs heeft zijn vermogen om te verwilderen verloren (OECD, 2003).

iii) Generatietijd;

Maïs is een eenjarig gewas.

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

Maïs is sexueel compatibel met alle in Europa geteelde maïsvariëteiten. Er komen in Europa geen wilde verwanten in de natuur voor waarmee maïs succesvol kan kruisen.

B3. Overlevingsvermogen

B3a) vermogen om overlevings- of ruststadia te vormen;

Maïs vormt per plant een aantal kolven met zaad. Op elke kolf zit een aantal rijen (8-16) met zaden (OECD, 2003). Cultuurmaïs laat de zaden niet spontaan vallen, maar houdt ze vast. Het vasthouden van de zaden is een van de belangrijkste domesticatie-eigenschappen van onze cultuurgraangewassen. Maïszaden kennen geen kiemrust en kunnen om die reden alleen bij bepaalde klimatologische omstandigheden overleven (HIN, 2001; COGEM, 2008).

In België is de kans dat maïs opslagplanten vormt in een navolgend gewas klein, maar niet nul. In de praktijk zijn er op verschillende plaatsen opslagplanten van maïs waargenomen. Deze maïsplanten waren niet erg groot en meestal ook niet erg rechtopstaand. Als er in België opslagplanten voorkomen dan gaat het om geïsoleerde planten. In Spanje komen maïsopslagplanten ook af en toe voor. Daarvan is bekend dat deze planten in 80% van de gevallen het stadium bereiken waarin ze mannelijke vruchtbaarheid bereiken en stuifmeel kunnen gaan verspreiden (Palau delmàs et al, 2009). Maïsexperts van ILVO zijn van mening dat ook in België niet kan worden uitgesloten dat opslagplanten van maïs het stadium van mannelijke vruchtbaarheid bereiken en stuifmeel gaan verspreiden.

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

Onder Europese omstandigheden is het vermogen van het zaad om de winter te overleven beperkt. Het optreden van opslag is om die reden zeldzaam. Opslagplanten worden in het algemeen door landbouwers bestreden met behulp van herbiciden, of door manueel of mechanisch de opslagplanten te verwijderen.

B4. Verspreiding

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

Maïs produceert een grote hoeveelheid pollen die mbv de wind wordt verspreid. Per plant kan dat variëren van 14 miljoen tot 50 miljoen pollenkorrels (Emberlin, 1999). Vergeleken met andere windbestuivers is het pollen van maïs relatief groot (diameter van gemiddeld 90 µm) en zwaar (0.25 µg) (Aylor et al., 2003; Di-Giovanni et al., 1995). Hierdoor verspreidt maïspollen zich niet erg ver. Experimenten hebben aangetoond dat 90% van het geproduceerde pollen binnen 5 meter en 98% binnen 25 tot 50 meter van de grens van het veld neerkomen. Boven de 50 meter is de pollenverspreiding echter niet nul. De windrichting en -sterkte kan hierbij een grote invloed hebben op het verspreidingspatroon. In het algemeen kan gesteld worden dat het kruisbevruchtingspercentage zeer snel afneemt met de afstand: rond de 1% op 10 meter en rond de 0.1% op 50 meter (Sigma project WP2, deliverables, www.inra.fr/sigma). Er zijn echter als gevolg van convectieve luchtstromen kruisbevruchtingshotspots gevonden tot op 650 meter afstand (Henry et al, 2003).

De levensduur van maïspollen is afhankelijk van luchtvochtigheid en temperatuur en kan variëren van 30 minuten tot 9 dagen (Emberlin et al, 1999).

N.B. In deze veldproef zullen de maïsplanten worden 'ontpluimd' (de mannelijke bloeiwijzen verwijderd), zodat ze geen pollen zullen kunnen verspreiden.

Wanneer maïszaden bij lage temperatuur en een laag luchtvochtigheidsgehalte bewaard worden, kan het zijn kiemkracht lang behouden. Temperaturen beneden het vriespunt en boven de 50 graden celcius, en/of een hoge luchtvochtigheid doen de kiemkracht relatief snel afnemen. Bij hoge luchtvochtigheid (boven de 80%) kan het vochtgehalte in de maïszaden stijgen, waardoor de maïszaden gevoeliger worden voor de aantasting door schimmels.

Zoals al eerder aangegeven laat maïs zijn zaden niet spontaan vallen. Verspreiding van maïszaden kan het gevolg zijn van oogstwerkzaamheden: tijdens de oogst kunnen zaden in de bodem terecht komen, en zaden kunnen over grotere afstanden buiten het perceel terecht komen als gevolg van transport.

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

De twee belangrijkste specifieke factoren die van invloed zijn op de verspreiding zijn (1) wind, en (2) menselijke activiteit.

Wind

Wind kan maïspollen over grotere afstanden (kilometers) verspreiden (Van Droogenbroeck et al, 2011, fig.12). De hoeveelheid pollen neemt met de afstand zeer snel af. Tijdens de bloei kan een dominante windrichting tot gevolg hebben dat de pollenwolk boven een perceel maïs een pluimvorm krijgt die zich in de windrichting over een grotere afstand van

het perceel verwijderd. In Vlaanderen is sprake van een dominante zuid-westelijke windrichting (Van Droogenbroek et al, 2011, fig.16).

Menselijke activiteit

Het zijn vooral de oogstwerkzaamheden en het daaropvolgende transport die kunnen leiden tot verspreiding van maïszaden. Toch leidt deze verspreiding van zaden niet tot verspeiding van maïs buiten de akker waarop de maïs geteeld is. Deels omdat de zaden worden opgegeten door vogels en dieren, maar vooral ook omdat maïs zijn vermogen om te verwilderen heeft verloren.

B5. Geografische verspreiding van de plant

Cultuurmaïs wordt op alle continenten geteeld. De origine van maïs ligt in Midden-Amerika (midden-zuiden van Mexico en Centraal-Amerika), wat algemeen ook gezien wordt als centrum van biodiversiteit. De domesticatie van maïs heeft naar alle waarschijnlijkheid op verschillende plaatsen tegelijkertijd plaatsgehad. In de tijd dat Columbus Amerika ontdekte werd maïs al van Chili tot Zuid-west Canada verbouwd, en ook op Cuba (OECD, 2003).

De originele habitat van maïs was hoogland met relatief sterke seizoensvariaties: droge winters en natte zomers (Wilkes & Goodman, in Maize Genetic Resources, CIMMYT, 1995). Maïs heeft echter blijk gegeven van een groot aanpassingsvermogen, en kan nu geteeld worden in heel verschillende omstandigheden qua vochtigheid, zonlicht, hoogte en temperatuur. Voor zijn verspreiding en overleving is de cultuurmaïs echter afhankelijk van de mens (OECD, 2003).

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

Maïs komt in België alleen voor als cultuurgewas. Maïs is in België het grootste landbouwgewas. In 2016 werd er in België ongeveer 221.000 ha maïs geteeld. Deze maïs wordt voor dierlijke consumptie geteeld, het grootste deel als kuilvoer, ongeveer een kwart als korrelmaïs. De grootste concentraties van de maïsteelt komen voor in de gebieden waar veel veeteelt voorkomt, zoals bijvoorbeeld de Kempen.

Wat ziekten en plagen betreft heeft maïs vooral te maken met schimmelziekten, zoals bijvoorbeeld bladvlekkenziekte die door verschillende schimmelsoorten veroorzaakt kan worden. Temperatuur en vochtigheid spelen een belangrijke rol in de ontwikkeling en verspreiding van de schimmels.

Maïskolven worden, vooral in de rand van percelen, soms aangevreten door duiven. Vaak zie je later dan schimmelaantasting op de aangevreten kolven. Bepaalde schimmels, zoals Fusarium, kunnen mycotoxines produceren die schadelijk zijn.

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

Bijlage C van het OECD consensus document 'on the biology of *Zea mays* ssp *mays* (OECD, 2003) vermeldt een lange lijst van insecten, schimmels, bacteriën en virussen die op maïs problemen kunnen veroorzaken. In delen van Europa, maar niet in België, is de Europese stengelboorder (*Ostrinia nubilalis*) een probleem.

Maïs is niet schadelijk voor mens of dier. Het bevat weinig antinutritionele stoffen (OECD, 2003). Maïs wordt al lang op grote schaal geconsumeerd, zowel door mensen als door dieren en kent een lange historie van veilig gebruik. Maïs staat ook niet bekend als een gekend allergeen. Allergieën tegen maïs bestaan wel, maar zijn uitzonderlijk (OECD,

2003). Maïs staat niet op de Europese lijsten van allergenen (bijlage IIIa van EU-richtlijn 2003/89) die op het label van een voedingsproduct vermeld moeten staan.

N.B. De maïs uit de proef zal niet worden geconsumeerd. Noch door dieren, noch door de mens.

C. INFORMATIE OVER DE GENETISCHE MODIFICATIE

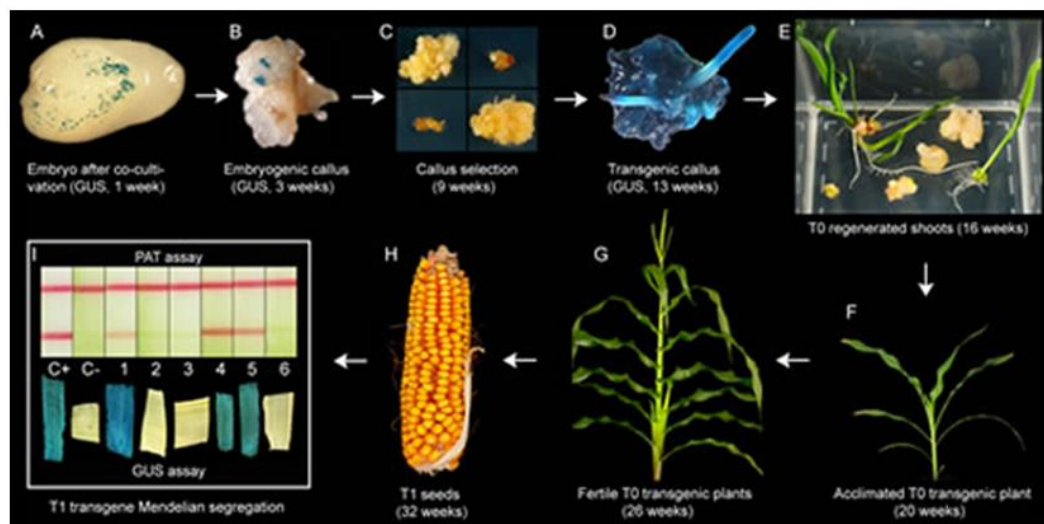
C1. Beschrijving van de voor de modificatie toegepaste methoden

De maïslijnen CCR1-1, CCR1-2, CCR3-1, CCR3-2, CCR3-3, CCR1-1_CCR3-1 en CCR1-2_CCR3-2 werden gemaakt door met behulp van CRISPR-Cas kleine wijzigingen (mutaties) in het erfelijk materiaal van de maïsplanten aan te brengen.

Voor het induceren van de mutaties zijn in een eerste fase de genen die coderen voor het CRISPR/Cas9-systeem met behulp van *Agrobacterium tumefaciens* in de plantencel geïntroduceerd. Het transgene plantenweefsel dat op deze manier werd gemaakt, produceert twee gids-RNA moleculen en het CAS9 enzym, die vervolgens in de cellen hun taak uitvoeren. Het CAS9 enzym is een endonuclease. Het gids-RNA zorgt ervoor dat het CAS9 enzym naar de gewenste plaats in het DNA wordt geleid, waarna het enzym in associatie met het gids-RNA op die plaats een breuk in het DNA veroorzaakt. Deze breuk wordt vervolgens door het van nature aanwezige DNA-reparatiesysteem ongedaan gemaakt. Het CAS9 enzym blijft het DNA echter doormidden knippen tot het moment dat er tijdens de reparatie een fout is opgetreden en er een mutatie is ontstaan waardoor het gids-RNA de plaats niet meer herkent. Vanuit dit transgene en gemuteerde weefsel zijn vervolgens planten geregenereerd. Uit de zo gemaakte planten zijn planten geselecteerd die gewenste mutaties bevatten en deze zijn aan een kruisingsprogramma onderworpen met het doel planten te verkrijgen die wel de mutatie(s), maar niet langer het T-DNA met de CRISPR/Cas9-genen bezitten. Het eindproduct van het proces is dus planten die een of meerdere mutaties maar geen soortvreemd DNA meer bevatten.

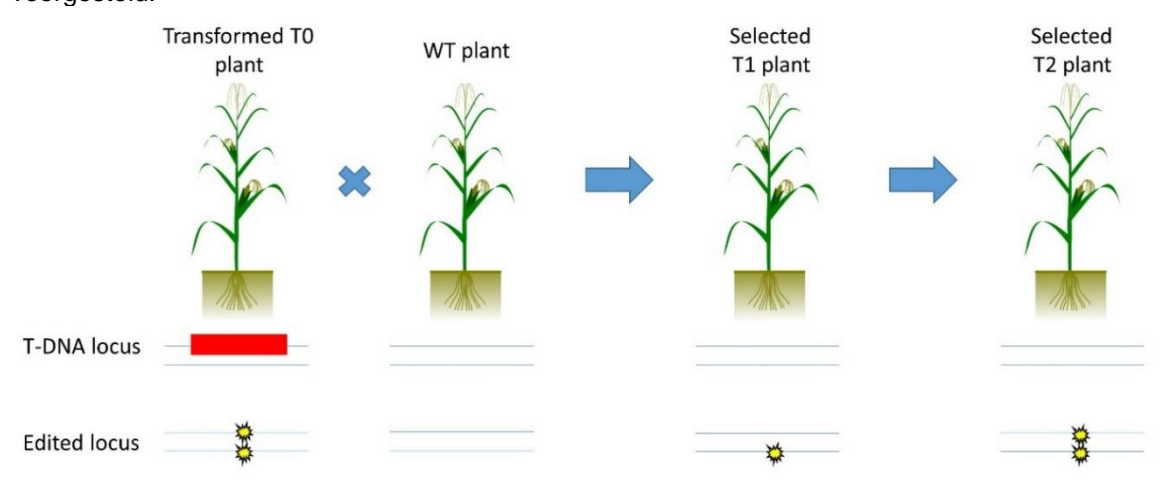
In detail: Onvolgroeide maïs-embryo's van de inteeltlijn B104 zijn met *Agrobacterium tumefaciens*, die de over te dragen modificatie op zijn T-DNA droeg, gecocultiveerd. De onvolgroeide maïsembryos zijn vervolgens omgezet in embryogeen callusweefsel. Na selectie op een medium dat hygromycine bevat is het callusweefsel aangezet tot de vorming van wortels en groene plantendelen. De kleine plantjes zijn geacclimatiseerd en vervolgens in potten uitgereoid tot volwassen planten.

Hieronder staat *ter illustratie* het transformatieproces schematisch weergegeven. In dit illustratieve schema zijn de planten met het *gus*-gen gemodificeerd (*N.B. de planten in deze aanvraag zijn niet met het gus-gen gemodificeerd*).



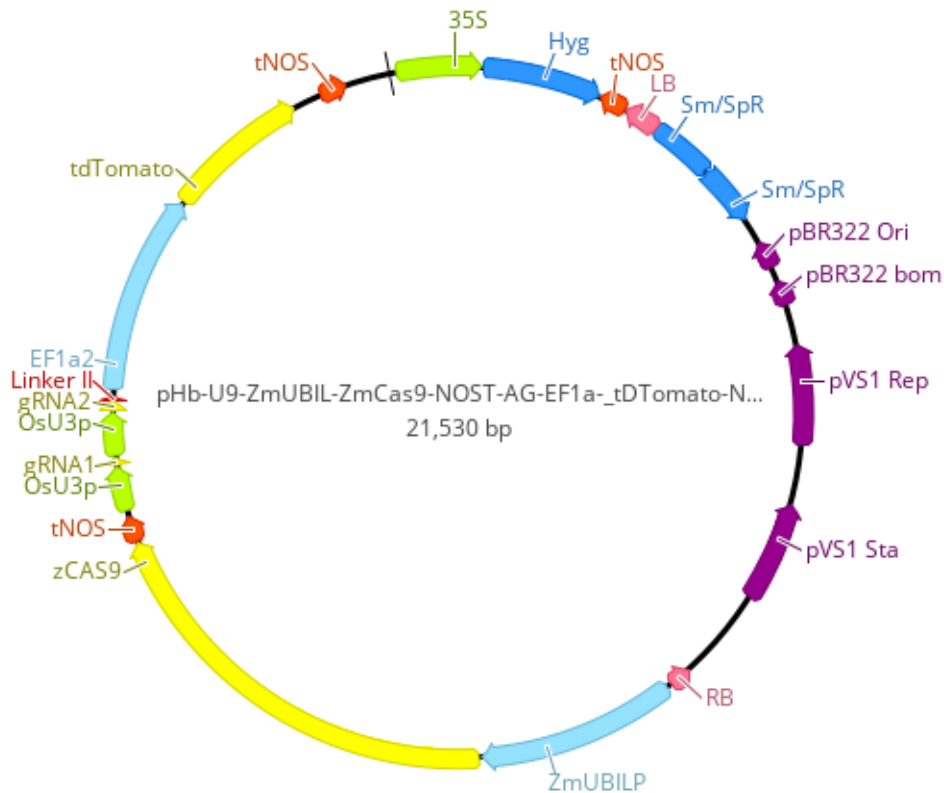
Planten met homozygote mutaties zijn geselecteerd voor terugkruising met de referentie maïslijn B104 planten. De nakomelingen van deze kruising werden gescreend op basis van gebrek aan qRT-PCR-detectie van het T-DNA construct met construct-specifieke primers. Deze primers detecteren verschillende elementen op het T-DNA, evenals de bacteriële resistentiemerker, gelegen op backbone van de transformatie-vector. Omdat er selectie met behulp van hygromycine heeft plaatsgevonden zijn enkel planten geselecteerd die het volledige T-DNA bevatten, en die dus ook zeker het Cas9-gen bevatten. In uitzonderlijke gevallen kan het ook gebeuren dat het volledige plasmide inclusief zijn backbone geïnsereerd wordt. Door nakomelingen te selecteren die geen amplificatie vertonen van enig onderdeel van het T-DNA, noch van de vector backbone, is er voldoende zekerheid dat het gaat om echte zogenoemde 'nul-segreganten' die geen soortvreemd DNA meer bevatten. Via genotypering is verder geselecteerd voor planten heterozygoot voor de geïnduceerde mutaties. Zelfbestuiving van deze planten gaf een segregerende populatie van wild type, heterozygote en homozygote mutanten. De T3 planten met de homozygote mutatie(s) zijn geselecteerd voor verder werk en worden gebruikt in de veldproef.

In onderstaande figuur worden de stappen nodig om homozygote T2 mutanten te bekommen voorgesteld.



C2. Aard en herkomst van de gebruikte vector

Om de CCR1-1, CCR1-2, CCR3-1, CCR3-2, CCR3-3, CCR1-1_CCR3-1 en CCR1-2_CCR3-2 maïslijnen te verkrijgen is de pHb-U9-ZmCas9-NOST-AG-EF1a-tD Tomato vector gebruikt. De vector en het T-DNA construct zijn niet meer aanwezig in de planten die op het veld staan, zoals beschreven in C1.



Figuur 1: vector map van de gebruikte transformatievector

Element	Size (bp)	Function	Origin
ZmUBILP	1.985	Maize ubiquitin promotor	Maize
ZmCas9	4.272	Maize codon optimized Cas9	<i>Streptococcus pyogenes</i>
tNOS	268	Transcription terminator	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
OsU3p	438	RNA promotor	Rice
gRNA1/gRNA2 + scaffold	103	Two guide RNAs selected for the CRISPR system	
LinkerII	49	Linker	
EF1a2	2.000	Promoter	<i>Brachypodium distachyon</i>
tdTomato	1.428	RFP fluorescent marker	<i>Discosoma sp.</i>
35S	864	Promoter	Cauliflower Mosaic Virus
Hyg	1.191	Hygromycin phosphotransferase, hygromycin resistance	<i>Escherichia coli</i>
Sm/SpR	1.252	Streptomycin adenylyltransferase, spectomycin resistance	<i>Escherichia coli</i>
pVS1 Rep	1.001	DNA elements required for replication/transfer in <i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
pVS1 Sta	1.001	DNA elements required for replication/transfer in <i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
pBR322 bom	261	DNA elements required for replication/transfer in <i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

pBR322 ori	281	DNA elements required for replication/transfer in <i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
LB	333	T-DNA left border	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
RB	231	T-DNA right border	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>

Table 1: de elementen aanwezig op de gebruikte transformatievector

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

Er zijn geen sequenties in de maïsplanten ingebouwd. Er zijn alleen enkele mutaties in het erfelijk materiaal van de planten aangebracht met behulp van CRISPR/Cas9.

Overzicht van de gewijzigde lijnen in de veldproef

N° van de event	Recipiënt	CRISPR-gemedieerde DNA-wijzigingen
CCR1-1	Inteeltlijn B104	Een 2bp deletie in het <i>CCR1</i> gen (positie 586-587 vanaf het startcodon in exon 1 van het <i>CCR1</i> gen)
CCR1-2	Inteeltlijn B104	Een 1bp deletie in het <i>CCR1</i> gen (positie 586 vanaf het startcodon in exon 1 van het <i>CCR1</i> gen)
CCR3-1	Inteeltlijn B104	Een 134bp deletie in het <i>CCR3</i> gen (positie 692-825 vanaf het startcodon in exon 1 van het <i>CCR3</i> gen)
CCR3-2	Inteeltlijn B104	Een 16bp deletie in het <i>CCR3</i> gen (positie 811-825 vanaf het startcodon in exon 1 van het <i>CCR3</i> gen) + inversie van het fragment tussen de twee gebruikte gRNAs in het <i>CCR3</i> gen (inversie op positie 692-811 vanaf het startcodon in exon 3 van het <i>CCR3</i> gen)
CCR3-3	Inteeltlijn B104	Een 133bp deletie in het <i>CCR3</i> gen (positie 693-825 vanaf het startcodon in exon 1 van het <i>CCR3</i> gen)
CCR1-1_CCR3-1	Inteeltlijn B104	Een 2bp deletie in het <i>CCR1</i> gen + een 134bp deletie in het <i>CCR3</i> gen (zie ook hierboven)
CCR1-2_CCR3-2	Inteeltlijn B104	Een 1bp deletie in het <i>CCR1</i> gen + een 16bp deletie in <i>CCR3</i> gen + inversie van het fragment tussen de twee gebruikte gRNAs in het <i>CCR3</i> gen (zie ook hierboven)

De met CRISPR-gewijzigde lijnen in B104 zijn homozygoot gemaakt voor de individuele mutaties.

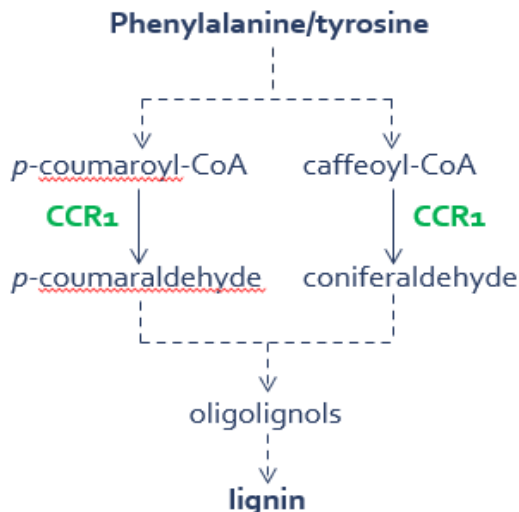
D. INFORMATIE OVER DE GENETISCH GEMODIFICEERDE PLANT

D1. Beschrijving van de eigenschappen die zijn geïntroduceerd of gewijzigd

De maïsplanten bevatten geen nieuw DNA.

De maïslijnen CCR1-1, CCR1-2, CCR3-1, CCR3-2, CCR3-3, CCR1-1_CCR3-1 en CCR1-2_CCR3-2 zijn verkregen door met behulp van de CRISPR/Cas9 technologie kleine wijzigingen (mutaties) aan te brengen in de genen *CCR1* en/of *CCR3*. In dit specifieke geval bestaan die mutaties uit het wegnemen van enkele basenparen op gerichte plaatsen in de betreffende genen, of het introduceren van een iets grotere deletie, en/of het introduceren van een inversie. De geïntroduceerde deleties verstoren het reading frame waardoor de genen hun functionaliteit verliezen. We kunnen dus spreken van *knock outs* (KO). De inversie die in CCR3-2 planten aanwezig is kan tot gevolg hebben dat er in de planten dubbelstrengs *CCR* mRNA moleculen gevormd worden die via een RNAi mechanisme een onderdrukkend effect zouden kunnen hebben op de expressie van de *CCR* genen in deze maïsplanten. Dit is nog onderwerp van verder onderzoek.

Maïs bezit een vijftal *CCR*-genen (*CCR1* t/m *CCR5*). Deze vijf genen zijn zogenoemde homologen (genen met grote sequentiegelijkenis die mogelijk eenzelfde functie hebben). *CCR1* en *CCR3* hebben de nauwste verwantschap. Ze katalyseren de eerste stap in de monolignol biosynthese. Monolignolen vormen de bouwstenen van de polymeer lignine. Lignine is een van de drie hoofdbestanddelen van de celwand van planten, naast cellulose en hemicellulose. Door de *CCR1* en/of *CCR3* genen uit te schakelen is er minder *CCR*-enzym in de planten aanwezig en dit heeft tot gevolg dat de relatieve en absolute hoeveelheid lignine in de planten verlaagd is. Vooral in de stam is het lignine-gehalte in de celwand gedaald (20-22%↓). In de planten met zowel een mutatie in *CCR1* als *CCR3* is ook in de bladeren het lignine-gehalte gedaald (11%↓). Daarnaast leidt de mutatie in het *CCR1* gen ook tot een lichte verkleuring van de stam. Die krijgt aan de buitenzijde een iets rodere kleur. Welke stoffen de rode kleur veroorzaken is nog onderwerp van onderzoek. De verlaagde en gewijzigde hoeveelheid lignine heeft tot gevolg dat bij vertering van de planten de suikers die in het cellulose en hemicellulose aanwezig zijn, gemakkelijker vrijgezet worden. Het komt er op neer dat de enzymen die het cellulose en hemicellulose afbreken gemakkelijker hun doelwit bereiken. De planten hebben een verhoogde verteerbaarheid.



Figuur 2: het enzym CCR en zijn plaats in de biosynthese van lignine

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

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

Niet van toepassing. Er is geen donormateriaal in het DNA van de plant geïntegreerd. Er zijn enkel mutaties aanwezig in de *CCR1* en *CCR3* genen.

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

Er zijn deleties in de *CCR1* en/of *CCR3* genen en in twee van de lijnen is er ook sprake van een inversie van een stuk DNA in het *CCR3* gen.

D2c) aantal kopieën van het donormateriaal;

Niet van toepassing. Er is geen donormateriaal in het DNA van de plant geïntegreerd.

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

Niet van toepassing. Er is geen donormateriaal in het DNA van de plant geïntegreerd.

D3. Informatie over de expressie van het donormateriaal

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

Niet van toepassing. Er is geen donormateriaal geïntegreerd in het chromosomaal DNA van de plant. Er zijn enkel kleine mutaties aangebracht in de *CCR1* en/of *CCR3* genen.

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

Niet van toepassing. Er is geen donormateriaal in de planten aanwezig.

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

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

In de serre zijn er geen wijzigingen waargenomen in de wijze waarop bloemen en zaden gevormd worden en zijn er ook geen wijzigingen waargenomen in de voortplantingssnelheid.

D4b) verspreiding;

Er zijn geen redenen om te veronderstellen dat er een verschil bestaat tussen de gewijzigde planten en hun ouderplanten voor wat hun verspreiding betreft. Ze vormen normale kolven met zaden die vastgehouden worden.

Nota bene: In dit geval zullen de planten ontmand worden, wat betekent dat er geen risico is op verspreiding van de wijzigingen via pollen.

D4c) vermogen om te overleven.

Er zijn geen redenen om te veronderstellen dat er een verschil zal zijn in het vermogen van pollen en zaden om te overleven. De in de serre gevormde zaden lijken in ieder geval een normale kiemkracht te hebben. De planten zelf hebben iets minder lignine in hun celwand. Dit zou eventueel kunnen leiden tot een grotere gevoeligheid aan legering en dat zou eerder een negatief effect kunnen hebben op het vermogen om te overleven. Maïs is een uitheemse plant die niet het vermogen heeft om zich in onze contreien te vestigen.

D5. Genetische stabiliteit van het donormateriaal en fenotypische stabiliteit van de genetisch gemodificeerde maïs

De geïntroduceerde genetische wijzigingen en het verlaagde lignine-gehalte zijn over meerdere generaties behouden gebleven in de serre.

D6. Wijziging in het vermogen van de genetisch gewijzigde maïs om genetisch materiaal op andere organismen over te dragen

Er zijn geen redenen om te veronderstellen dat enkele wijzigingen in de biosynthese van lignine zou leiden tot een wijziging in het vermogen om genetisch materiaal op andere organismen over te dragen.

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

De celwanden van de maïsplanten hebben een lichtjes gewijzigde samenstelling. De verhouding tussen de hoeveelheid cellulose, hemicellulose en lignine is anders dan in niet-gewijzigde maïsplanten. Het aandeel lignine is lager. Lignine is een polymeer die als een soort van cement vervlochten zit met de cellulose- en hemicellulosevezels. Cellulose, hemicellulose en lignine zijn niet toxisch of allergeen. Mensen en dieren consumeren deze stoffen dagelijks, met name als gevolg van de consumptie van vers plantaardig voedsel zoals groenten en fruit. Wanneer mensen of dieren (en met name herkauwers) de gewijzigde maïsplanten zouden eten, dan wordt verwacht dat zij meer energie uit de maïs halen als gevolg van het feit dat de verteerbaarheid van de maïs verhoogd is. De verlaagde hoeveelheid lignine maakt dat de cellulose- en hemicellulosevezels gemakkelijker beschikbaar komen voor afbraak, met als gevolg dat een groter deel van de suikermonomeren vrijkomen. Dit is niet schadelijk en zorgt ook niet voor allergische of andere schadelijke effecten.

D8. Informatie over de veiligheid van de genetisch gewijzigde maïs voor de gezondheid van het dier, in het bijzonder wat betreft toxische, allergene of andere schadelijke effecten als gevolg van de genetische modificatie, voorzover de genetisch gewijzigde maïs bedoeld is voor gebruik in diervoeders

Zie D7.

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

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

D10. Eventuele veranderingen in de interacties van de genetisch gewijzigde maïs met niet-doelwitorganismen die voortvloeien uit de genetische modificatie.

Het is niet uitgesloten dat een wijziging van de samenstelling van de celwand tot veranderingen leidt in de interacties met niet-doelwitorganismen. Uit veldproeven met genetisch gemodificeerde populieren waarin vergelijkbare wijzigingen in de celwand waren doorgevoerd bleek bijvoorbeeld dat de samenstelling van de micro-organismen die in de planten aanwezig zijn gewijzigd is (Beckers et al., 2016). Of de planten gevoeliger zijn voor schimmels of andere ziekten is niet gekend.

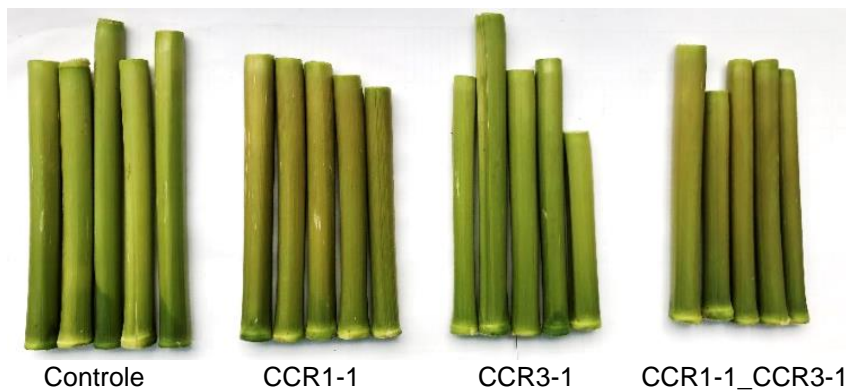
D11. Eventuele interacties met het abiotische leefmilieu.

Wij voorzien geen bijzondere interacties met het abiotische leefmilieu.

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

Er is een aantal technieken voorhanden waarmee de mutaties die in het DNA van de plant zijn aangebracht kunnen worden vastgesteld. Het betreft met name PCR mbv primers die specifiek zijn voor de doelwitsequenties gevolgd door sequenering. Het aantreffen van dergelijke mutaties in plantaardig materiaal geeft, afhankelijk van de situatie, echter geen 100% uitsluitel over de vraag of het om de in deze aanvraag beschreven planten gaat. Het is immers ook mogelijk dat dezelfde mutaties spontaan ontstaan of het gevolg zijn van klassieke veredelingsstechnieken. Voor de beschrijving van de detectie- en bepalingstechnieken zie bijlage.

Fenotypisch onderscheiden de maïsplanten zich van andere maïsplanten, door een rodere stengelkleur.



Figuur 3 : de roodverkleuring in *CCR1*-mutanten in maïs

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

De beschreven planten zijn nog niet eerder in het veld geïntroduceerd geweest. Ze zijn enkel in een serre bestudeerd.

Wel zijn er eerdere veldproeven uitgevoerd in de VS met vergelijkbare maïsplanten. Het ging daarbij om planten met mutaties in het *CCR1* gen waarin de hoeveelheid lignine iets minder verlaagd was dan de planten die in de voorgestelde veldproef zullen worden geïntroduceerd (Smith et al, 2017; Tamasloukht et al, 2011). Planten met mutaties in het *CCR3* gen zijn nog niet eerder in het veld geïntroduceerd geweest.

E. INFORMATIE OVER HET INTRODUCTIEGEBIED

E1. Ligging en omvang van het introductiegebied

Het introductiegebied ligt in de gemeente Wetteren op gronden die behoren tot het ILVO. Een liggingsplan is bijgevoegd in bijlage. Het introductiegebied zal inclusief buffer niet meer dan 900 m² bedragen.

E2. Beschrijving van het ecosysteem van het introductiegebied

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

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

Er is sprake van een gematigd zeeklimaat met relatief zachte temperaturen in de winter (kans op lichte tot soms matige vorst) en gematigde temperaturen in de zomer (tot ongeveer 33 °C), een overheersende zuid-westelijke windrichting, en een over het jaar verspreide neerslag van ruim 800 liter per vierkante meter (www.meteo.be).

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

Niet-genetisch gemodificeerde maïsplanten zullen direct rondom de genetisch gewijzigde maïsplanten gezaaid worden. Anders gezegd: de proef wordt in een bestaand maïsperceel ingepast. Ook daarbuiten bevinden zich in de nabije omgeving percelen met niet-genetisch gewijzigde maïs.

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

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

F. INFORMATIE OVER DE INTRODUCTIE

F1. Doel van de introductie

De veldproef vindt plaats in het kader van wetenschappelijk onderzoek naar de groei en ontwikkeling van planten. In dit geval heeft deze wetenschappelijke veldproef de volgende doelen:

- 1) Nagaan of de planten ook onder reële teeltcondities eenzelfde gewijzigde samenstelling van de celwand hebben die leidt tot een verhoogde verteerbaarheid.
- 2) Nagaan of de wijzigingen geen negatieve gevolgen hebben zoals een grotere gevoeligheid voor legering of een lagere opbrengst.

F2. Geplande datum/data en duur van de introductie

De proef zal aanvangen eind april of begin mei 2022 en lopen tot en met oktober 2023. De proef neemt dus twee achtereenvolgende groeiseizoenen in beslag.

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

De maïs zal met de hand worden gezaaid.

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

Het introductiegebied zal voorafgaand aan de introductie een mechanische grondbewerking (ploegen / cultivator / grondfrees) ondergaan met het doel een voldoende luchtig en verkruid zaaibed te verkrijgen.

Gedurende het seizoen zal een of enkele keren met een herbicide en/of handmatig het onkruid bestreden worden, zoals gebruikelijk is in de teelt van maïs. Er zal geen glufosinaat worden gebruikt.

De oogst van de genetisch gewijzigde maïsplanten zal met de hand gebeuren. Daarbij zal er vooral gelet worden op het verzamelen van alle kolven/zaden, ook de allerkleinste. Dit is immers het enige reproductieve materiaal.

Na de oogst zal het perceel enige tijd braak liggen om vervolgens ten laatste in het eerstvolgende voorjaar geploegd te worden. De proef zal twee achtereenvolgende seizoenen op hetzelfde perceel, maar om wetenschappelijke redenen niet op exact dezelfde plaats worden uitgevoerd.

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

Ongeveer 10 planten per m², waarbij de oppervlakte van de gemodificeerde maïs samen met de oppervlakte van de referentielijnen en bufferrijen niet meer dan 900m² zal bedragen.

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

G1. Genomen voorzorgsmaatregelen:

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

De afstand tot niet-genetisch gewijzigde maïsplanten zal klein zijn. De proef wordt ofwel ingeplant midden in een bestaand maïspaneel, ofwel zal er zich op maximaal 150m een maïspaneel bevinden.

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

Om verspreiding van de genetisch gemodificeerde eigenschap te verhinderen zullen de genetisch gewijzigde maïsplanten worden ontpluimd voordat er sprake is van verspreiding van pollen. Op deze manier wordt verspreiding van de gemodificeerde eigenschap naar omliggende maïsplanten voor de volle 100% voorkomen.

De monitoring op bloeiwijzen zal starten vanaf het moment van de vorming van het laatste blad. De proefplot zal dan drie keer per week bezocht worden om te controleren op mannelijke bloeiwijzen. De ervaring met de eerdere maïsveldproeven B/BE/11/V4 en B/BE14/V2 heeft geleerd dat het niet nodig is om dagelijks te gaan controleren. De mannelijke bloemen worden verwijderd van zodra ze voelbaar zijn en zichtbaar worden en de ervaring heeft geleerd dat er zo 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 van zodra alle mannelijke bloeiwijzen verwijderd zijn (het aantal planten in de proef is in detail bekend (ook per rij), en het aantal verwijderde mannelijke bloeiwijzen per rij wordt strikt bijgehouden, dus men weet perfect wanneer alle mannelijke bloemen verwijderd zijn. Bovendien is dit ook visueel te controleren. Mochten op 15 september nog niet alle mannelijke bloemen verwijderd zijn, dan zal sowieso op die datum met monitoring en bloemverwijdering worden gestopt, omdat de eventuele verspreiding van stuifmeel op dat moment geen aanleiding meer kan geven tot de verspreiding van genetisch gewijzigd materiaal. De kolven in de omringende maïs en de verre omgeving zijn dan immers allang bevrucht zijn geweest en volop met zaden gevuld.

Er zal rondom de genetisch gewijzigde en referentiemaïs een buffer van 3 meter met niet-genetisch gewijzigde maïs gehanteerd worden als bestuiverlijnen die net zoals de proefplot na de oogst vernietigd zal worden (zie proefplan).

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

Het plot zal na de oogst gedurende een korte periode braak liggen en dan gedurende de winter of ten laatste in het eerstkomende voorjaar worden geploegd.

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

De oogst van de maïsplanten zal handmatig gebeuren. Een aantal planten zal volledig worden geoogst om van die planten telkens parameters zoals het gewicht en het droge-stofgehalte te bepalen van de stengels, de bladeren en de kolven. Van de overige planten worden enkel de kolven geoogst. Dit gebeurt zeer zorgvuldig waarbij ook de allerkleinste kolven worden verwijderd. Al het geoogste materiaal gaat in zorgvuldig gelabelde, gesloten zakken en wordt in een gesloten voertuig naar ILVO of VIB vervoerd voor verder

onderzoek. Materiaal dat niet meer nodig is voor verder onderzoek zal worden geïnactiveerd. Alle stengels en bladeren die achterblijven op het veld, zullen daar verhakseld worden. Stengels en bladeren zijn niet reproductief en om die reden geen GGO meer. Wortels en onderste deel van de stengel zullen in de grond achtergelaten worden en composteren.

G4. Beschrijving van controleplannen en –technieken

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. Deze periode van intensieve monitoring start zoals onder G1b al vermeld op het moment dat het laatste blad gevormd wordt en om de twee dagen plaatshebben totdat alle mannelijke bloeiwijzen zijn verwijderd of doorlopen tot 15 september. Mannelijke bloemen worden met de hand in hun geheel verwijderd. De pluimen worden in gesloten houders afgevoerd in een gesloten vervoermiddel en worden geïnactiveerd.

G5. Beschrijving van noodmaatregelen

Een eerste noodmaatregel is dat de veldproefplot zal worden voorzien van een buffer van 3 meter met niet-genetisch gewijzigde maïsplanten die net als de proefplot na oogst zal worden vernietigd. Mocht er een genetisch gewijzigde maïsplant omwaaien, dan zal die plant door de buffer worden opgevangen.

Er is voor een buffer met maïsplanten gekozen in plaats van een buffer in de vorm van gras of braakligging, om randeffecten in de veldproefplot zo veel mogelijk te voorkomen.

Er zou zich in de praktijk een aantal calamiteiten kunnen voordoen. Een voorbeeld is moedwillige beschadiging van de proef. Zodra dit wordt opgemerkt zal het beschadigde materiaal dat niet meer te redden is zorgvuldig worden opgeruimd en vernietigd.

Een tweede calamiteit die zich zou kunnen voordoen is dat de auto met zakken met geoogste kolven bij een ongeval betrokken zou raken en dat de kolven op straat zouden belanden. Als dat gebeurt dan zal al het materiaal zorgvuldig worden verzameld, bijeengeveegd en in tonnen worden gedaan die afgesloten worden, om vervolgens hun reis naar het onderzoeksdepartement weer te hervatten.

G6. Methoden en procedures om het gebied te beschermen

De proef vindt plaats op een privé domein dat omgeven is door een gesloten hekwerk en dat verboden toegang is voor onbevoegden.

H. ONDERTEKENING

H1. Namens de rechtspersoon VIB:

Naam: Jo Bury

Functie: managing director, VIB

Opgemaakt te Gent, op

Handtekening:

H2. Verantwoordelijk onderzoeker:

Naam: Wout Boerjan

Handtekening:

H3. Bioveiligheidscoördinator:

Naam: René Custers

Handtekening:

Referenties

- Aylor D (2003) Rate of dehydration of corn (*Zea mays* L.) pollen in the air. *J. Exp. Bot.* 54: 2307–2312
- Beckers B., Op De Beeck M., Weyens N., Van Acker R., Van Montagu M., Boerjan W. and Vangronsveld J. (2016). Lignin engineering in field-grown poplar trees affects the endosphere bacterial microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 2312-2317.
- CIMMYT, 1995, Maize Genetic Resources
- COGEM advies CGM/080131-04, 31 januari 2008
- Di-Giovanni F, Kevan P, Nasr M (1995) The variability in settling velocities of some pollen and spores. *Grana* 34: 39–44
- Emberlin et al, A report on the dispersal of maize pollen, January 1999.
- Henry C, Morgan D, Weekes R, Daniels R, Boffey C (2003), Farm scale evaluations of GM crops: monitoring gene flow from GM crops to non-GM equivalent crops in the vicinity: part I: forage maize. DEFRA report EPG 1/5/138, http://www.defra.gov.uk/environment/gm/research/pdf/epg_1-5-138.pdf
- Hin CJA, 2001, Landbouwkundige risico's van uitkruising van GGO-gewassen, Centrum voor Landbouw en Milieu, 2001.
- OECD, 2003, Consensus document on the biology of *Zea mays* ssp. *mays*
- Palau-delmas, M., G. Peñas, E. Melé, J. Serra, J. Salvia, M. Pla, A. Nadal and J. Messeguer (2009). "Effect of volunteers on maize gene flow." *Transgenic Research* 18(4): 583-594.
- Sigma project WP2, deliverables, www.inra.fr/sigma
- Smith, R.A., Cass, C.L., Mazaheri, M. et al. Suppression of CINNAMOYL-CoA REDUCTASE increases the level of monolignol ferulates incorporated into maize lignins. *Biotechnol Biofuels* 10, 109 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0793-1>
- Tamasloukht B, Lam MSJWQ, Martinez Y, Tozo K, Barbier O, Jourda C, Jauneau A, Borderies G, Balzergue S, Renou JP, et al. Characterization of a cinnamoyl-CoA reductase 1 (CCR1) mutant in maize: effects on lignification, fibre development, and global gene expression, *Journal of Experimental Botany*, Volume 62, Issue 11, July 2011, Pages 3837–3848, <https://doi.org/10.1093/jxb/err077>
- Van Droogenbroeck B, Taverniers I and De Loose M (2011). De Vlaamse regelgeving omtrent co-existentie: een evaluatie in praktijkomstandigheden, Eindrapport, ILVO

Bijlagen

1. Gezondheids- en leefmilieurisicobeoordeling
2. Moleculaire karakterisatie
3. Liggingsplan
4. Ontwerp veldproefplan
5. Proefprotocol
6. Monitoringsplan
7. Verklaring inzake burgerlijke aansprakelijkheid
8. Verklaring inzake levering van controlestalen
9. Detectie- en bepalingstechnieken
10. Bewijs van betaling van dossiertaks
11. SNIF formulier
12. Vertrouwelijke gegevens