

BIJLAGE 1: GEZONDHEIDS_ EN LEEFMILIEURISICOBEOORDELING

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

De gewijzigde maïsplanten hebben een mutatie in een histon gen dat een van de bouwstenen van chromatine vormt. Proeven in de serre met maïsplanten onder droogtestress tonen aan dat dit histon gen extra tot expressie komt tijdens periodes van droogte en suggereren dat de groei van de planten onder die omstandigheden wordt gepauzeerd en er overgegaan wordt op een basisgroeiproces. Door het histon gen te muteren wordt de pauzeknop als het ware uitgeschakeld.

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

Genoverdracht van plant naar plant is als gevolg van de veldproef niet mogelijk. De mannelijke bloemen worden immers verwijderd voordat ze pollen zouden kunnen gaan verspreiden. Mocht dergelijke genoverdracht wel mogelijk zijn dan zouden er naar ons oordeel geen selectieve voordelen op de ontvangende planten worden overgedragen. De genetische eigenschap is immers recessief wat betekent dat de ontvangende planten geen fenotype zullen vertonen. Pas wanneer via kruising twee mutante allelen bij elkaar komen zullen de ontvangende planten ook een droogtetolerantie kunnen vertonen. Maar nogmaals, wij achten het uiterst onwaarschijnlijk dat een droogtetolerantie er voor zou kunnen zorgen dat maïs zich nu ineens wel in de Belgische natuur zou kunnen gaan vestigen.

2. Genoverdracht van planten naar micro-organismen

Succesvolle genoverdracht van de gewijzigde planten naar micro-organismen wordt bijzonder onwaarschijnlijk geacht. Er zijn als gevolg van de genoombewerking met behulp van CRISPR-Cas immers geen sequenties ingebracht die een eventuele genoverdracht zouden kunnen bevorderen, zoals microbiële gensequenties die homologe recombinatie tussen sequenties in de plant en in micro-organismen kunnen bevorderen. De wijzigingen beperken zich tot kleine deleties of een kleine inversie in bestaande genen van de maïs. De kans dat dergelijke genen door micro-organismen worden opgenomen is niet anders dan de kans dat enig willekeurige maïssequentie wordt opgenomen met enig welke willekeurige mutatie die daarin eventueel spontaan is opgetreden.

3. Interacties van de gewijzigde planten met doelwitorganismen

Niet van toepassing. De wijziging die in de maïs is aangebracht is niet gericht op een bepaald doelwitorganisme. De maïsplanten zijn enkel aangepast de organisatie van hun chromatine.

4. Interacties van de gewijzigde planten met niet-doelwitorganismen

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

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

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

6. Effecten op biogeochemische processen

Wij voorzien geen bijzondere interacties met of effecten op biogeochemische processen.

7. Effecten op de gezondheid van mens en dier

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

De maïs uit de veldproef zal niet in de voedsel- of veevoederketen worden geïntroduceerd. Al het reproductief materiaal – de kolven met zaden – wordt afgevoerd naar het laboratorium waar het wordt gebruikt voor verder onderzoek of wordt vernietigd. Niet-reproductief materiaal wordt op het veld verhakseld zal daar composteren. De blootstelling aan de gewijzigde maïs door mens en dier beperkt zich tot de mensen die de zaden en planten in het veld manipuleren en eventuele dieren die in het veld met de maïs in aanraking komen en er eventueel iets van eten.

8. Conclusie

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

Bijlage 2: Moleculaire karakterisatie

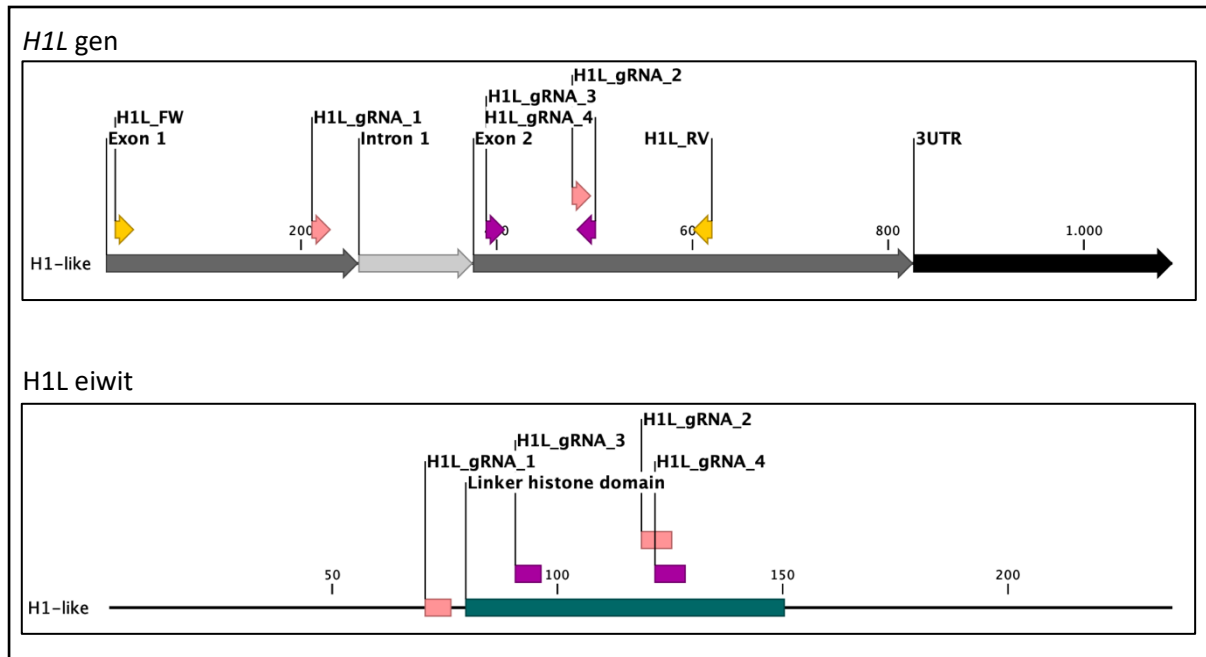
De aanwezige mutaties in de *h1l* CRISPR lijnen Da en C zijn gekarakteriseerd door middel van PCR-amplificatie van de regio in het DNA dat werd getarget door de ontworpen gRNAs. Vervolgens werd het PCR product gevisualiseerd op een 1% agarose gel en opgezuiverd voor sanger sequencing om de exacte aard van de mutatie te bepalen. Hieruit is gebleken dat beide lijnen een grote deletie bevatten in het *H1L* gen, -266 bp voor lijn Da en -79 bp voor lijn C. Beide mutaties veroorzaken een out of frame deletie waardoor het H1L eiwit niet meer functioneel is. Om de afwezigheid van T-DNA en backbone vector te bevestigen werd een qPCR uitgevoerd.

Voor de veldproef wordt er T3 zaad gebruikt dat afkomstig is van homozygote *h1l* mutanten en wildtype (WT) planten uit een segregerende T2 generatie. Na een backcross van de getransformeerde T0 generatie met een B104 WT plant, wordt er in de T1 generatie geselecteerd op planten die geen T-DNA maar wel een edit bevatten in het *H1L* gen. De T1 generatie wordt gepropageerd via zelfbestuiving om een segregerende T2 populatie te bekomen. Vervolgens volgt er in de T2 generatie zelfbestuiving van zowel homozygote *h1l* planten als planten die geen edit in *H1L* bevatten. Deze planten, die geen edit bevatten, worden gebruikt als controle (WT) planten voor de homozygote *h1l* mutanten in de T3 generatie.

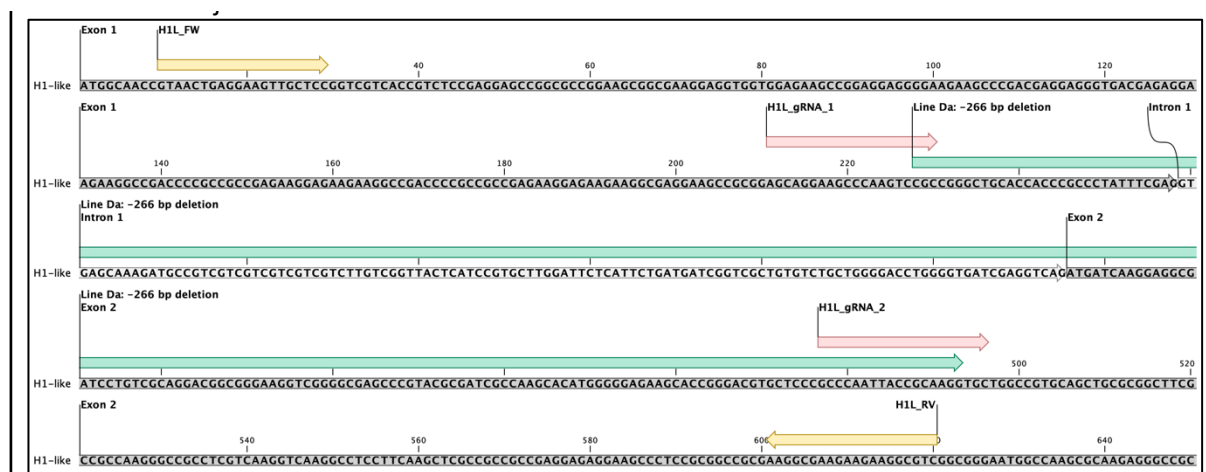
Mutaties in *H1L*

Twee onafhankelijke CRISPR constructen met telkens twee gRNAs werden ontworpen tegen een functioneel domein van H1L in maïs. Voor construct 1 zijn dit H1L_gRNA_1 en H1L_gRNA_2 en voor construct 2 H1L_gRNA_3 en H1L_gRNA_4 (**Figuur 1**). Voor de veldproef gebruiken we een mutant allel van elk construct, namelijk lijn Da van construct 1 en lijn C van construct 2. Beide lijnen bevatten een grote deletie tussen de twee gRNAs, lijn Da: -266 bp en lijn C: -79 bp, die telkens tot een out of frame deletie leiden (**Figuur 2**). Beide lijnen zijn dus knock out mutanten waarbij het H1L eiwit niet meer functioneel is.

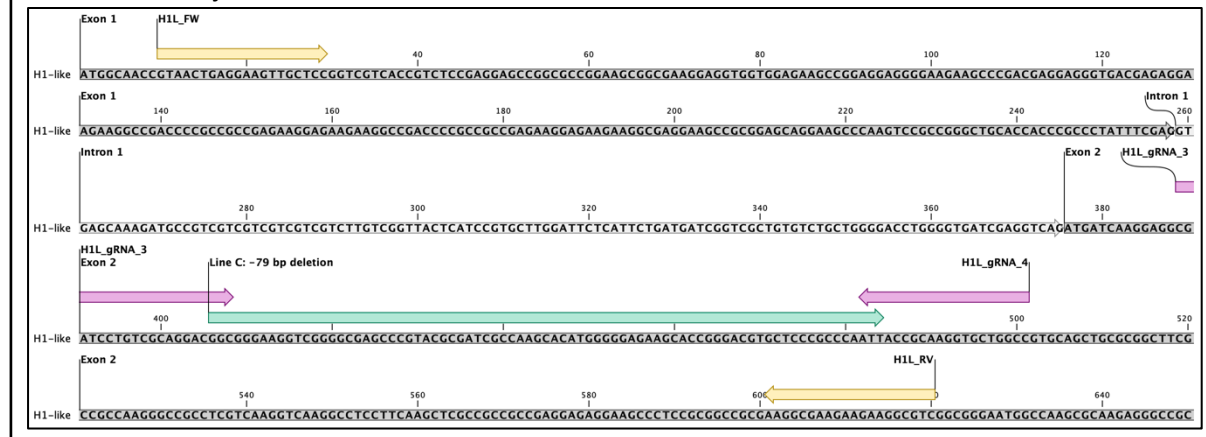
WT



Figuur 1: De annotatie van het HISTON1-like (H1L) gen en eiwit in de maïs B104 inteeltlijn. De positie van de gRNAs voor zowel lijn Da (roos) als voor lijn C (paars) op gen- en eiwit niveau. Exon = donker grijs, intron = licht grijs, 3UTR = zwart, primers gebruikt voor de genotypering = geel, histon linker domein = groen.



Construct 2 – Lijn C



Figuur 2: h1L CRISPR constructen: lijn Da en lijn C. Lijn Da bevat een -266 bp deletie tussen H1L_gRNA_1 en H1L_gRNA_2. Lijn C bevat een -79 bp deletie tussen H1L_gRNA_3 en H1L_gRNA_4. Exon = donker grijs, intron = licht grijs, primers gebruikt voor de genotypering = geel, gRNAs lijn Da = roos, gRNAs lijn C = paars, deleties = groen.

Op basis van het hierna beschreven protocol kan worden nagegaan of de plant al dan niet edits bevat in het *H1L* gen.

Isolatie van genomisch DNA

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

PCR

Primers

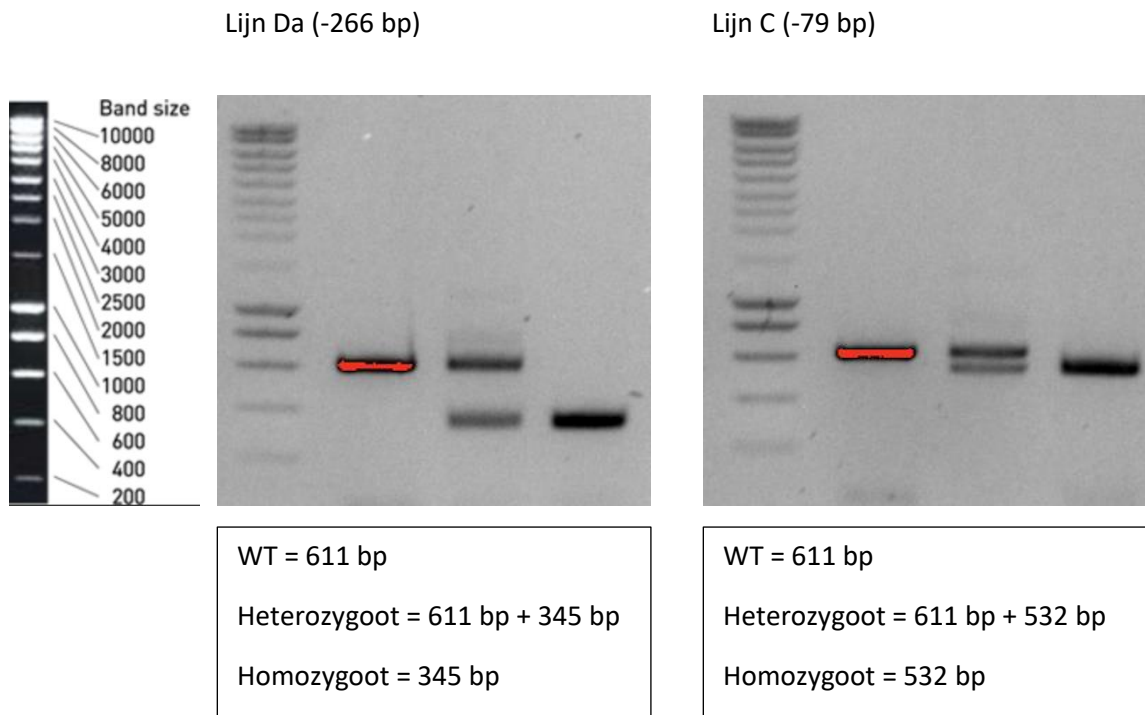
Target	Sequentie	T _{smelt}	T _{annealing}	Amplicon
<i>H1L</i>	GTAACGAGGAAGTTGCTCC	63	65	611 bp
	GACGCCTTCTTCTCGCCTT	68		

PCR mix per reactie

reactie buffer	5 µL
10 mM dNTPs	0.5 µL
10 µM FW primer	1.25 µL
10 µM RV primer	1.25 µL
gDNA	1 µL
Q5 polymerase	0.25 µL
GC enhancer	5 µL
H ₂ O	10.75 µL
Totaal volume	25 µL

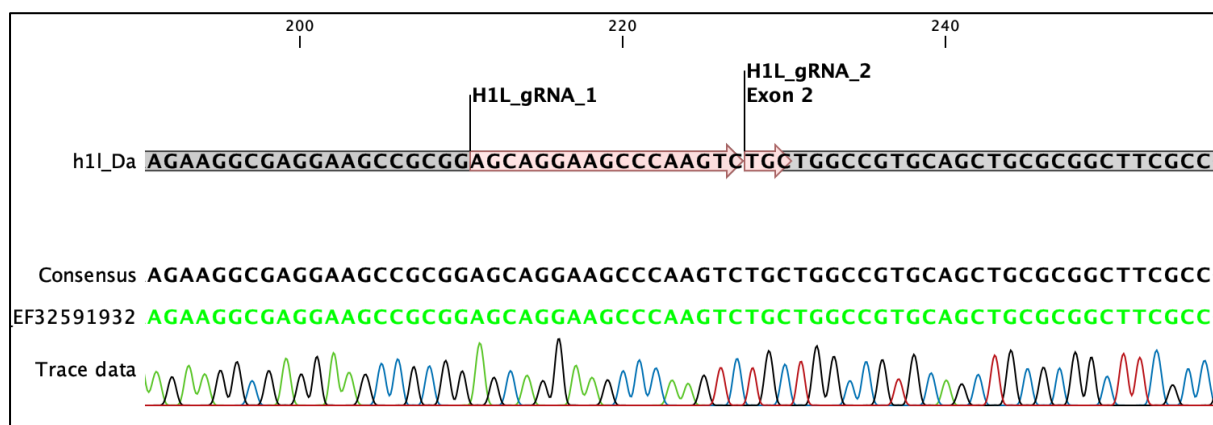
PCR programma

Stap 1:	5'	98 °C
Stap 2:	15''	98 °C
	15''	65 °C
	25''	72 °C
Stap 3:	Stap 2, 34 keer herhalen	
Stap 4:	2'	72 °C
Stap 5:	Product bewaren bij 4 °C	

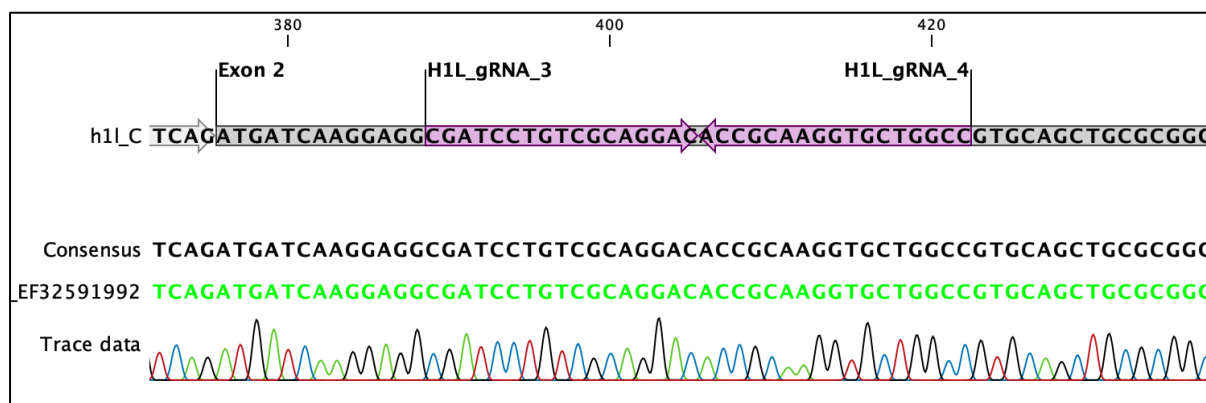


Figuur 3: Scheiding van de PCR producten op een 1% agarose gel (30min, 150V) voor WT en *h1L* CRISPR mutanten, lijn Da en lijn C.

Voor beide lijnen werd het PCR product van homozygote *h1L* mutanten gesequeneerd om de grootte van de deletie te bepalen (**Figuur 3** en **4**).



Figuur 4: *h1L* CRISPR mutant voor lijn Da met een deletie van -266 bp tussen H1L_gRNA_1 en H1L_gRNA_2.



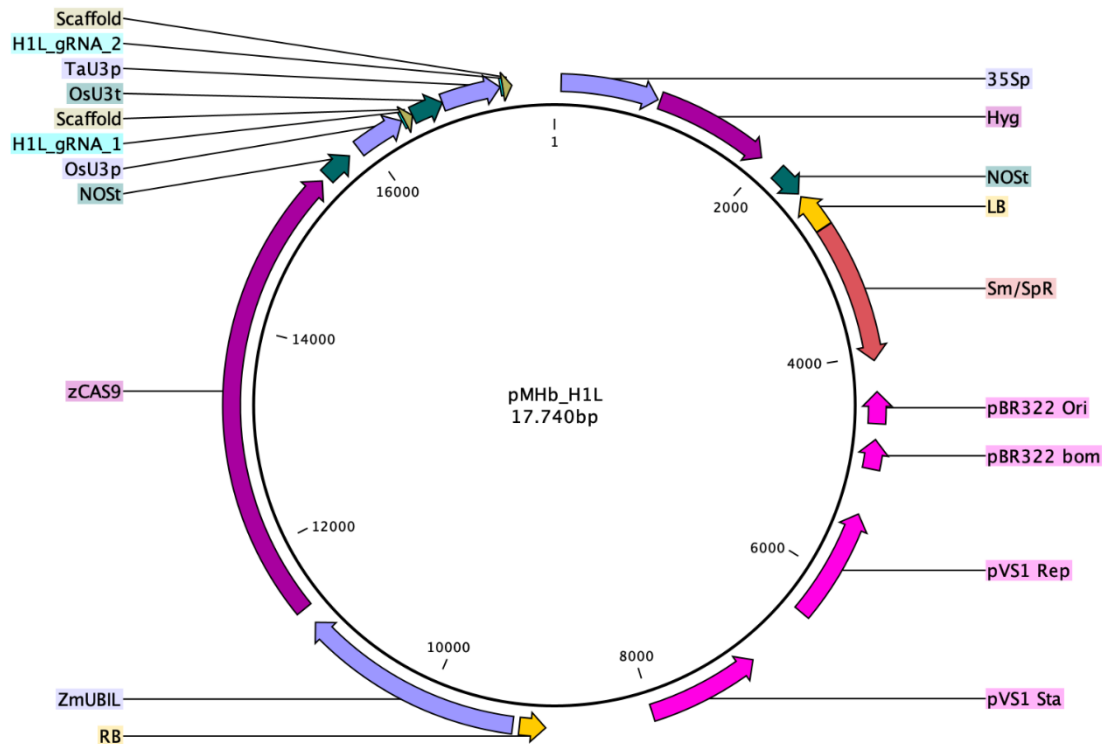
Figuur 5: *h1L* CRISPR mutant voor lijn C met een deletie van -79 bp tussen *H1L_gRNA_3* en *H1L_gRNA_4*.

qPCR

Om de afwezigheid van T-DNA en backbone vector te valideren in de T3 zaden voor de veldproef, wordt er een qPCR uitgevoerd op het genomisch DNA van de parentale planten. Hierbij wordt een *h1L* CRISPR plant uit de T0 generatie gebruikt als positieve controle (T0), evenals een plant uit vroeger onderzoek die backbone vector bevat (BB). Een B104 WT plant die geen transformatie heeft ondergaan en vrij is van T-DNA en backbone vector, wordt gebruikt als negatieve controle. Primers worden ontworpen voor de verschillende regio's van het T-DNA en de backbone vector (**Figuur 6**). Huishoudegenen *EF1alfa* en *18S* werden gebruikt om expressie levels te normaliseren. De qPCR werd uitgevoerd met SYBR® Green volgens standaard procedures.

Primers

Target	Primer sequentie
Backbone vector (BB)	TTAAACACCACGCACGTTGC CGCTCTTTACGATCTTGTAGCG
Left border (LB)	AAAGTCTGCCGCTTACAAC TCGGCACAAAATCACCACTC
Right border (RB)	GATTGTCGTTTCCCGCCTTC GCACATACAAATGGACGAACGG
zCas9_1	TAATGCTTGTGCTGCTCGAC TGCCGTCCAAGTATGTGAAC
zCas9_2	CTGCATGAAATTGCGTTTCG AAGTCATCAACGGCATTTCG
zCas9_3	TGTTGCCGAAGATTGGATGC ATGGCGAAGTTGACGATTC
p35S	GAACTCGCCGTAAAGACTGG TCAATTGCCCTTTGGTCTTC
Hygro(mycin)	GATGTAGGAGGGCGTGGATA ATAGGTCAGGCTCTCGCTGA
EF1a	AGTCCGTTGAGATGCACCATG CACATACCCACGCTTCAGATCC
18S	ACCTTACCAGCCCTTGACATATG GACTTGACCAAACATCTCACGAC



LB: left border of the T-DNA

RB: right border of the T-DNA

OsU3p: promoter of the rice (*Oryza sativa*) U3 gene

OsU3t: terminator of the rice (*Oryza sativa*) U3 gene

TaU3p: promoter of the wheat (*Triticum aestivum*) U3 gene

H1L_gRNA_X: the guide RNA that is recognized by Cas9

pZmUbiL: promoter of the maize (*Zea mays*) ubiquitin1 gene

zCas9: maize codon-optimized coding sequence of *Streptococcus pyogenes* Cas9

NOST: terminator of *Agrobacterium tumefaciens* nopaline synthase gene

p35S: Cauliflower mosaic virus "35S" promoter

Hygro: hygromycin – plant resistance marker

Sm/Sp: spectinomycin – bacterial resistance marker

Figuur 6: h1l CRISPR construct : transformatie vector met de positie van de qPCR primers

Resultaten en besluit qPCR

Uit onderstaande grafiek kunnen we afleiden dat de expressie levels voor de verschillende regio's uit het T-DNA en de backbone vector in de B104 WT plant niet detecteerbaar is in vergelijking met de BB en T0 positieve controles. De expressie niveaus van B104, de negatieve controles, zijn gelijkaardig aan die van de ouderplanten die gebruikt worden om het T3 zaad te propageren voor de veldproef (**Figuur 7 en 8**), waardoor we kunnen besluiten dat de ouderplanten geen T-DNA noch backbone bevatten.

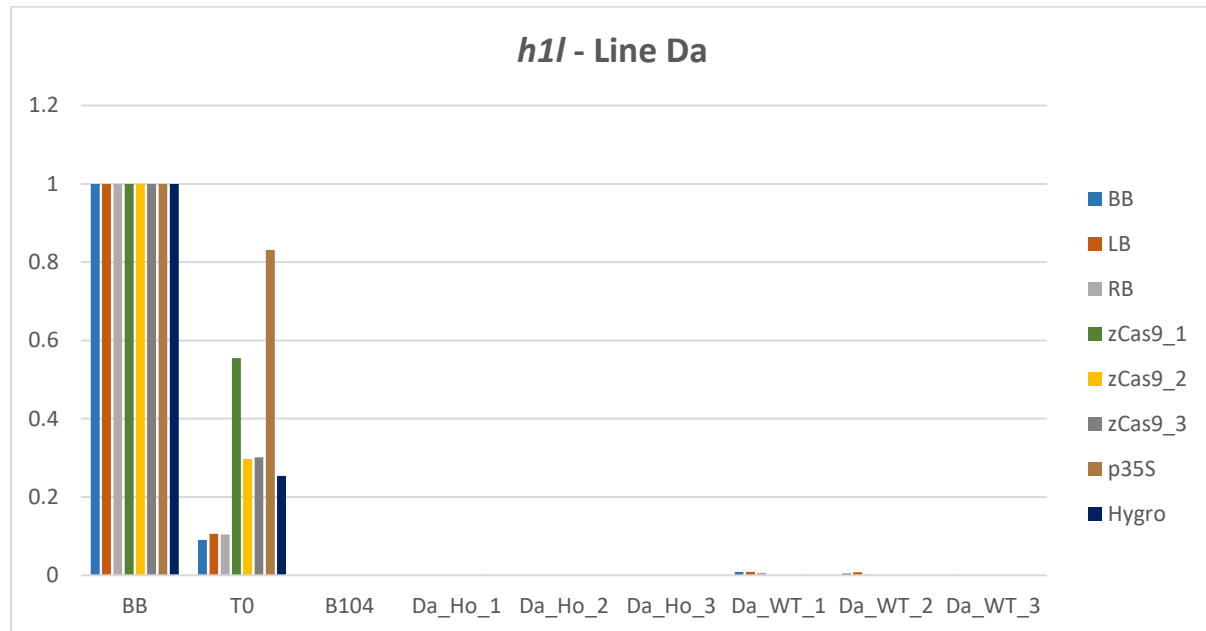


Figure 7: qPCR die de afwezigheid van T-DNA en backbone vector bevestigt in segregerende WT en h1I planten van lijn Da in de T2 generatie die gebruikt worden voor de propagatie van T3 zaad.

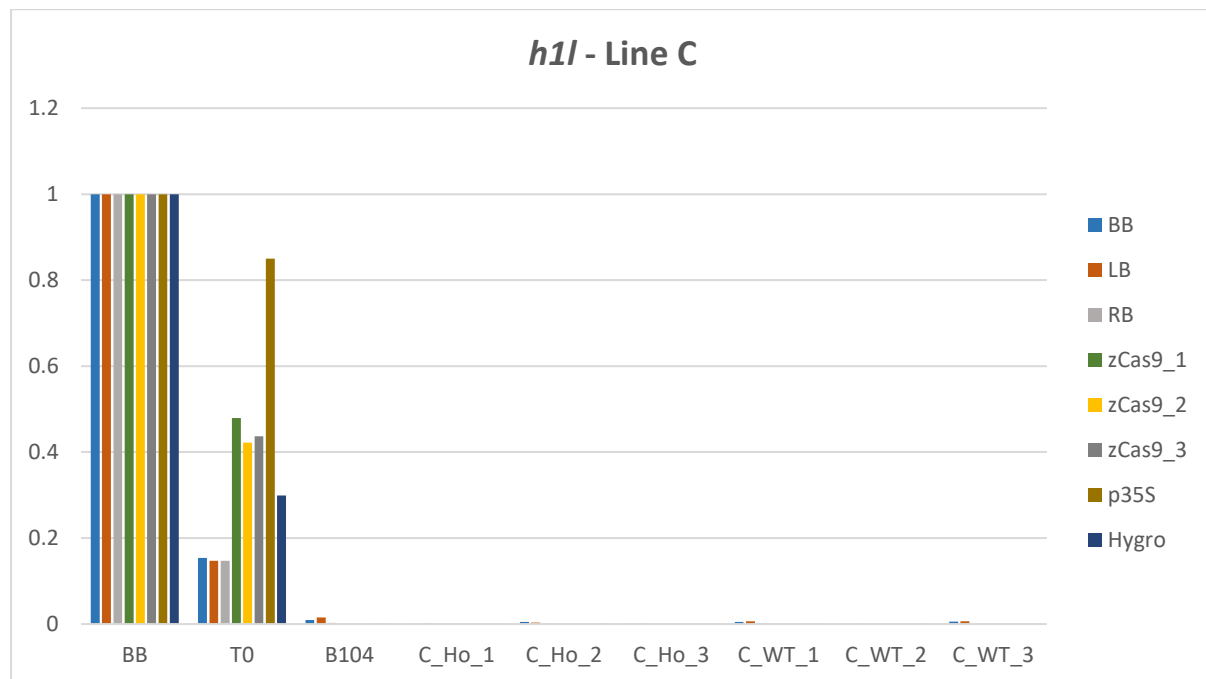
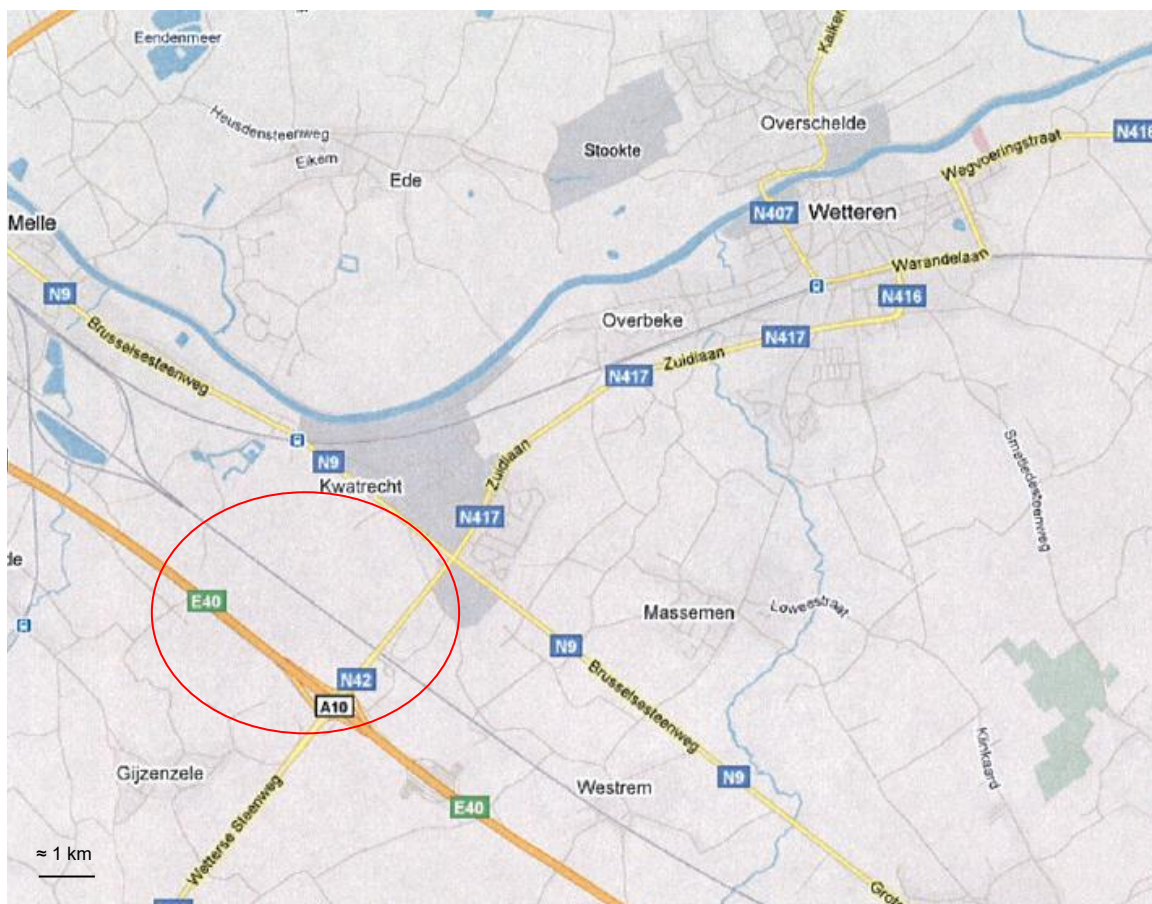


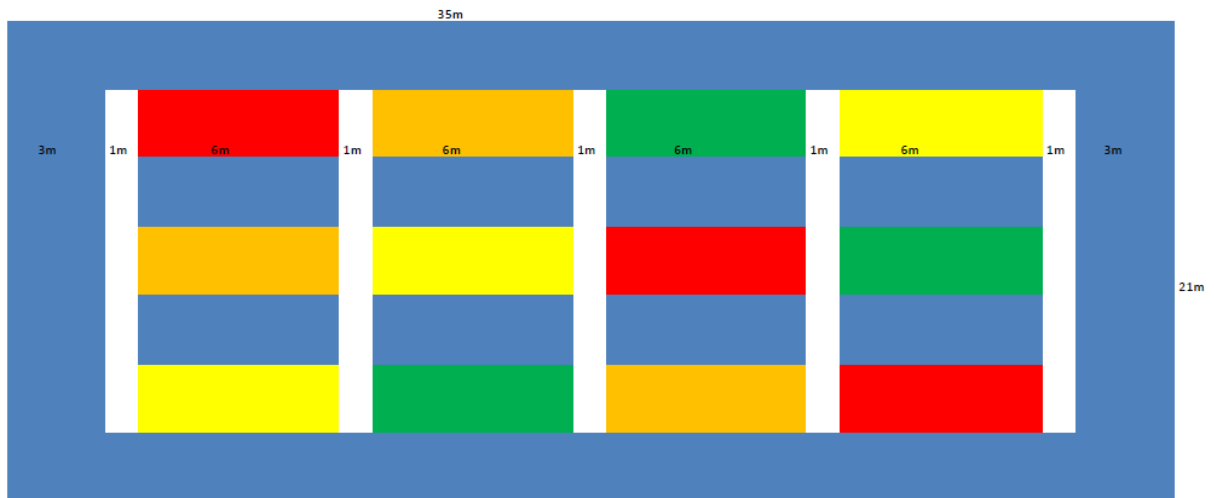
Figure 8: qPCR die de afwezigheid van T-DNA en backbone vector bevestigt in segregerende WT en h1I planten van lijn C in de T2 generatie die gebruikt worden voor de propagatie van T3 zaad

BIJLAGE 3: LIGGINGSPLAN



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

Bijlage 4 Plotplan H1L



<ul style="list-style-type: none"> B104 h1L_Da h1L_C WT_Da WT_C 	<ul style="list-style-type: none"> 10 planten/m² 10 planten/m² 10 planten/m² 10 planten/m² 10 planten/m² 10 planten/m² 	<ul style="list-style-type: none"> 3 x 180 planten 3 x 180 planten 3 x 180 planten 3 x 180 planten 3 x 180 planten
---	--	---

BIJLAGE 5: PROEFPROTOCOL

1. Verantwoordelijkheden

De rechtspersoon VIB is de verantwoordelijke voor de proef.

2. Logboek

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

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

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

- Onverwachte calamiteiten

In het logboek zullen de volgende gegevens worden genoteerd:

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

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

3. Zaai van de proef

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

Voorafgaand aan de plantwerkzaamheden zal een grondbewerking plaatshebben met het doel een voldoende fijn zaaibed te vormen.

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

4. Werkzaamheden tijdens de groeiperiode

Bemesting

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

Onkruidbestrijding

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

Monitoring

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

5. Oogst en vervoer van de maïsplanten

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

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

6. Volgende teelt

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

7. Afwijkingen

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

8. Activiteitenverslag

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

9. Eindverslag

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

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

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

BIJLAGE 6: MONITORINGSPLAN

Monitoring gedurende de proef

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

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

Monitoring na afloop van de proef

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

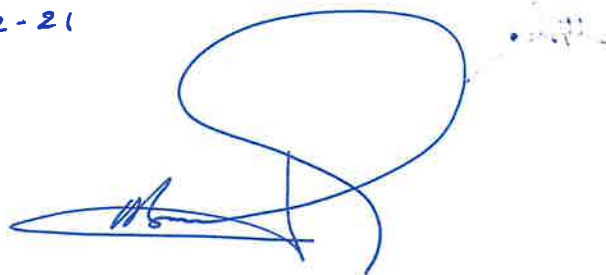
BIJLAGE 7: VERKLARING INZAKE BURGERLIJKE AANSPRAKELIJKHEID

Ondergetekende Jo Bury, managing director van VIB, verklaart dat VIB de volledige burgerlijke aansprakelijkheid op zich neemt voor wat betreft de schade die aangebracht zou worden aan de gezondheid van mens en dier, aan goederen of aan het leefmilieu als gevolg van de proefnemingen.*

Voor de bepaling van de burgerlijke aansprakelijkheid zal toepassing worden gemaakt van de regels neergelegd in de artikelen 1382 e.v. van het Burgerlijk Wetboek.

Datum: 23-12-21

Handtekening:



Jo Bury
Managing director, VIB

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

BIJLAGE 8: VERKLARING INZAKE LEVERING VAN CONTROLESTALEN

Ondergetekende Jo Bury, managing director van VIB, verklaart dat de VIB ten laatste 15 dagen na het begin van de proef aan de SBB de nodige controlestalen met de bijbehorende wetenschappelijke informatie zal bezorgen. De controlestalen zullen bestaan uit DNA afkomstig van de in de proef gebruikte genetisch gemodificeerde lijnen, met de nodige bijbehorende informatie.*

De controlestalen zullen geen gestandaardiseerde referentiestalen zijn.

Datum: 03/08/22

Handtekening: 

Jo Bury
Managing director, VIB

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

BIJLAGE 9: Detectie en bepalingstechnieken

Op basis van het hieronder beschreven protocol kan nagagaan worden of maïsplanten al dan niet edits bevatten in het H1L gen die gelijk zijn aan de edits die zich bevinden in het genetisch materiaal van de maïsplanten uit de veldproef.

Stap 1: Isoleer DNA uit het plantenmateriaal volgens onderstaand protocol

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

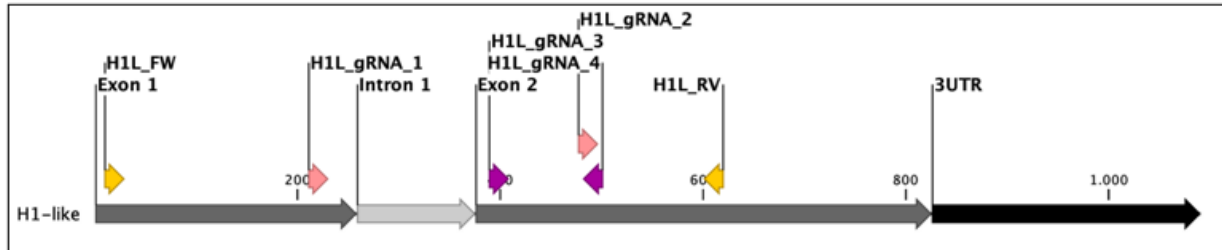
Stap 2: Voer een PCR uit op het geïsoleerde genomisch DNA

Er moeten een positieve en negatieve controle worden meegenomen in de PCR. Als negatieve controle kan bijvoorbeeld genomisch DNA worden gebruikt van ouderlijn B104, of enig andere niet-genetisch gewijzigde maïslijn. En als positieve controle kan genomisch DNA gebruikt worden afkomstig van de H1L Da en H1L C maïslijnen. Het experiment moet minimaal in duplo worden uitgevoerd.

Target, primers, temperaturen en amplicongrootte van de PCR:

Target	Sequentie	T _{smelt}	T _{annealing}	Amplicon
H1L	GTAAGTGGAGGAAGTTGCTCC	63	65	611 bp
	GACGCCTTCTTCTTCGCCTT	68		

H1L gen



Figuur 1: alignering van de FW en RV primers op het H1L gen

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

PCR mix per reactie

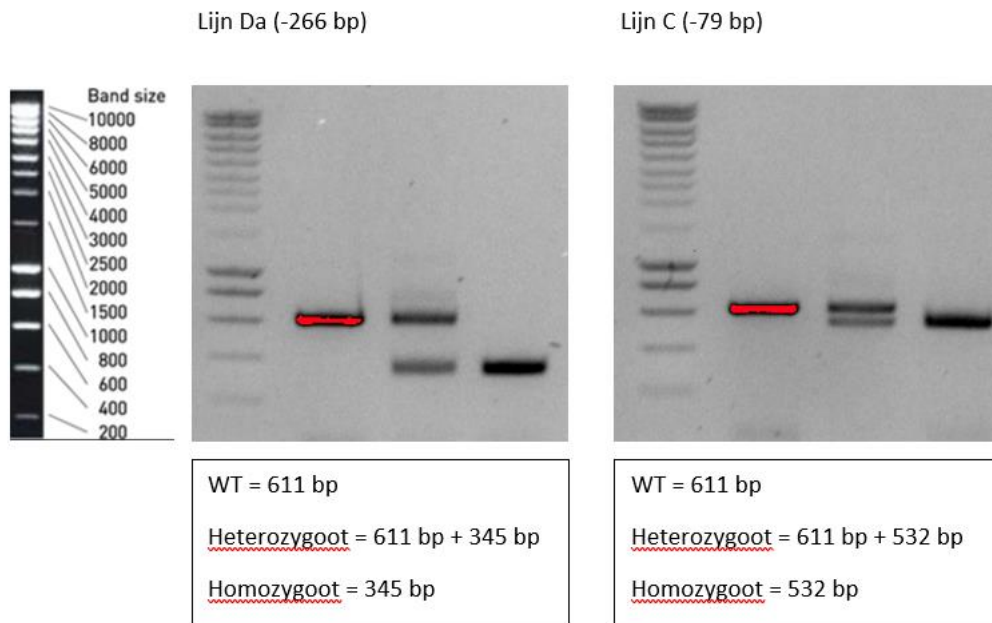
reactie buffer	5 µL
10 mM dNTPs	0.5 µL
10 µM FW primer	1.25 µL
10 µM RV primer	1.25 µL
gDNA	1 µL
Q5 polymerase	0.25 µL
GC enhancer	5 µL
H ₂ O	10.75 µL
Totaal volume	25 µL

PCR programma

Stap 1: 5'	98 °C
Stap 2: 15''	98 °C
	15'' 65 °C
	25'' 72 °C
Stap 3:	Stap 2, 34 keer herhalen
Stap 4: 2'	72 °C
Stap 5:	Product bewaren bij 4 °C

Scheiding van de PCR producten

Scheidt de PCR producten vervolgens op een 1% agarose gel (30 min, 150V) voor wildtype maïs en mogelijks H1L mutant materiaal. Maak hierbij gebruik van een DNA ladder en maak het DNA zichtbaar met een DNA bindende kleurstof zoals Ethidiumbromide, Sybr Safe of Gel Green. Indien een bandje van 345 bp verschijnt, dan kan dit materiaal zijn dat van H1L Da planten afkomstig is. Verschijnt er een bandje van 532 bp, dan kan dit materiaal zijn dat van H1L C planten afkomstig is. Zie figuur 2 hieronder.



Figuur 2: scheiding van PCR producten afkomstig van H1L Da en H1L C mutante planten op een 1% agarosegel

De exacte grootte van de PCR producten is aan de hand van de scheiding op de agarose gel niet te bepalen. Snijdt de bandjes daarom uit de agarose gel en isoleer het DNA eruit. Bepaal vervolgens de sequentie van de PCR producten om na te gaan hoe groot de deletie in het H1L gen in het materiaal precies is.

Disclaimer

Indien een deletie van -266 bp of van -79 bp wordt aangetroffen in het H1L gen van het materiaal, dan geeft dat nog geen 100% zekerheid dat het om respectievelijk H1L Da of H1L C materiaal gaat. Het is immers niet volledig uit te sluiten dat dergelijke mutaties ook spontaan kunnen ontstaan.

BIJLAGE 10: Betaling van dossiertaks

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

Summary Notification Information Format

A. General information

A1. Details of notification

Notification Number

B/BE/22/V3

Member State

Belgium

Date of Acknowledgement

.....

Title of the Project

Scientific field evaluation of maize with modified growth characteristics

Proposed period of release:

15/04/2022 to 31/10/2024

A2. Notifier

Name of the Institute

VIB

A3. Is the same GMPt release planned elsewhere in the Community?

No.

A4. Has the same GMPt been notified elsewhere by the same notifier?

No

B. Information on the genetically modified plant

B1. Identity of the recipient or parental plant

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

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

The genetically modified maize plants have a mutation in the gene coding for a histon linker protein which leads to the inactivation of the gene. As a result, the plants have a significantly better growth during periods of drought.

B3. Type of genetic modification

Targeted editing of genes using CRISPR-Cas.

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

There is no donor DNA inserted into the genetic material. The genome editing has resulted in small deletions in the gene coding for the histon linker protein.

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

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

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

Not applicable.

C. Experimental Release

C1. Purpose of the release

The purpose of the release is to measure the performance of the modified maize plants under normal field conditions and learn whether they also in these conditions have an altered composition of their cell wall. The field trial also has the goal to determine whether the modification would lead to undesired effects such as a higher vulnerability for breaking of their stem during strong winds.

C2. Geographical location of the site

The field trial will take place on grounds belonging to the ILVO research institute in the municipality of Wetteren.

C3. Size of the site (m²)

The trial plot, including non-modified controls, non-modified fertilizer lines and non-modified buffer rows is 735 m².

C4. Relevant data regarding previous releases carried out with the same GM-plant, if any, specifically related to the potential environmental and human health impacts from the release

The lines have not been field tested before.

D. Summary of the potential environmental impact from the release of the GMPTs

The environmental impact from the release is expected to be zero. The modified characteristics are not expected to lead to greater weediness or the ability of the maize to establish in non-agricultural habitats. The modified characteristics are also not expected to change the interaction of the maize with herbivores or other non-target organisms.

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

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

The risk of spread of the modified properties to the environment is mitigated by removing the tassel, thus preventing the spread of modified pollen to non-modified maize plants in the surroundings. The formed modified seeds are, as already stated above, well retained in the cobs and these cobs will be very carefully hand harvested, thus preventing any spread of seeds to the environment. Experience with such field trials in the past 8 years has shown that the way the cobs are harvested effectively prevents any volunteers being formed. The field trial plot is surrounded by a 1.80 m high wire fence to prevent accidental trespassing and accidental removal or spread of GM material.

F. Summary of foreseen field trial studies focused to gain new data on environmental and human health impact from the release

There are no specific studies foreseen to gain new data on the environmental and human health impact from the release other than the study of the phenotype and growth characteristics of the maize.

G. Final report

-

H. European Commission administrative information

To be filled in by the Commission

I. Consent given by the Competent Authority:

To be filled in by the Commission.