



Virtuele casus gentech siergewassen, fase 1

PT14661, een vervolgproject van PT13973

Dr. F.A. Krens



Productschap  Tuinbouw

Plant Research International, onderdeel van Wageningen UR
Wageningen UR Plant Breeding
Februari 2013

Eindrapport

© 2013 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Plant Research International. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: Wageningen UR Plant Breeding.

DLO is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Exemplaren van dit rapport kunnen door heffingbetalers van het internet gedownload worden via www.tuinbouw.nl van het Productschap Tuinbouw.



PT-projectnummer 14661

**Plant Research International, onderdeel van Wageningen UR
Wageningen UR Plant Breeding**

Adres : Postbus 16, 6700 AA Wageningen
: Wageningen Campus, Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
Tel. : 0317 – 48 09 62
Fax : 0317 – 41 80 94
E-mail : info.pri@wur.nl
Internet : www.wageningenUR/nl/pri

Inhoudsopgave

	Pagina
1. SAMENVATTING	1
2. INLEIDING	2
3. RESULTATEN	3
3.1 Afbakening fase 1	3
3.2 Concept aanvraag veldproef categorie 1	3
3.3 Commentaar BGGO en COGEM	4
3.3.1 Categorie 1	4
3.3.2 Categorie 2 of meer	4
3.3.3 Overig	5
4. CONCLUSIES	6
5. BIJLAGE I. Lelies met luisresistentie, concept aanvraag	1
A. Algemene gegevens	3
Doel van de introductie in het milieu	4
Vergunningaanvrager	4
B. Gegevens over de uitgangsplantensoort	4
Naam van de uitgangsplantensoort	4
Geografische verspreiding	5
Voortplanting	5
Overleving	6
Verspreiding	6
Uitkruising	7
Interacties met andere organismen	7
Identificatiekenmerken	8
C. Algemene gegevens over de genetische modificatie	8
Eerdere of meerdere modificaties	8
Algemene gegevens over de genetische modificatie	8
DNA dat gebruikt is om de plant te modificeren	8
D. Gegevens over de genetisch gemodificeerde plant (ggp)	10
Geschiedenis	11
Eigenschappen	11
Insertie	11
Expressie	12
Verschillen van het ggp en eventuele uitkruisingsproducten ten opzichte van de uitgangsplantensoort	12
E. Gegevens over de voorgenomen introductie in het milieu	14
Locatie	14
Ecosysteem	15
Opzet van experiment en introductie	16
Vervoer	16
Na afloop van het experiment	16
F. Analyse van de te verwachten effecten van de ggp op mens en milieu	17
G. Voorgestelde maatregelen voor inperking en risico management	19
H. Voorgestelde methoden van observatie tijdens en na afloop van het experiment	20

1. SAMENVATTING

Om in Europa genetisch gemodificeerde siergewassen te kunnen verkopen is een toelating nodig afgegeven door de competente autoriteiten binnen de EU. Om die toelating te verkrijgen is een traject nodig van eerst aanvragen voor veldproeven in meerdere categorieën (van 1 tot 3, die in principe allemaal doorlopen moeten worden, tenzij er voldoende informatie is uit eerdere aanvragen) en tot slot de aanvraag voor introductie in het milieu, marktintroductie. Directe aanvragen voor marktintroductie zonder veldproeven bleek niet mogelijk; er zijn geen aparte aanvraagformulieren voor, maar wel een samenvattingsformulier. De informatie die nodig is voor een marktintroductie is niet op voorhand af te leiden uit een bestaand formulier maar wordt bekend per casus uit het te volgen verplichte traject van veldproefaanvragen. Om meer duidelijkheid te verkrijgen voor een siergewas is besloten om in dit PT-project 14661 een concept aanvraag veldproef categorie 1 op te stellen gebaseerd op binnen een ander PT project (14587) geproduceerde merker-vrije gentech lelies met resistentie tegen bladluizen. Deze conceptaanvraag is voorgelegd aan vertegenwoordigers van Bureau GGO en de COGEM en door hen bestudeerd. Vervolgens is die doorgesproken en hiermee is meer duidelijkheid verkregen over wat er nog aan informatie nodig is voor diezelfde categorie 1 aanvraag en is zoveel mogelijk geïdentificeerd van wat er in dit stadium al aangeven kan worden aan informatie die voor verdere aanvragen categorieën 2 en 3 en voor marktintroductie nodig zal zijn.

De conceptaanvraag veldproef categorie 1 voor merker-vrije gentech lelies voldeed al bijna volledig aan de eisen het verkrijgen van een vergunning om een veldproef te beginnen. Voor verdere aanvragen zou er nog aanvullende informatie nodig zijn. Dit betrof informatie over:

1. de plant, namelijk over opslag en overleving van bollen in de grond
2. moleculaire analyse op DNA niveau, zoals bepaling van het kopie aantal van de T-DNA inserties en van de basenvolgorde van de overgangsgebieden van lelie naar T-DNA
3. biochemische analyse op genexpressie en kwantificering van de genproducten
4. effecten op niet-doelwit organismen, insecten (5 klassen) en bodem(micro)organismen
5. afbraaksnelheid in de bodem van geproduceerd doeleiwit met het bedoelde effect op bladluizen

Een deel van de aanvullende informatie kan wanneer die eenmaal verkregen is direct weer hergebruikt worden bij andere aanvragen voor gewassen met dezelfde geïntroduceerde genen. Dit zal daar de kosten en tijd drukken. De totale kosten voor een marktintroductie van een gentech siergewas zullen lager zijn dan voor een voedsel- of veevoedergewas want voedingsproeven en samenstellingsbepalingen zijn niet (of zeer beperkt) nodig in geval van gentech siergewassen. In dit specifieke geval is één van de ingebrachte genen van dierlijke origine. Dit vergt extra onderzoek noodzakelijk voor de aanvragen 2 en verder en daarmee extra kosten. Resumerend voor deze casus kost het totale traject zoveel tijd en geld dat het economisch niet haalbaar is voor een individueel lelie ras. Voor gentech siergewassen gemodificeerd qua bloemkleur of rood blad of qua plantvorm zijn mogelijk minder aanvullende proeven nodig en daarmee zullen de totale kosten in die gevallen lager zijn. Dit hangt samen met het feit dat de bloemkleur-bepalende stoffen al in planten bekend en aanwezig zijn.

Kruisen van niet GGOs met eenmaal goedgekeurd gentech materiaal van dezelfde soort mag en de kruisingsproducten hoeven niet opnieuw aan de toelatingsprocedure onderworpen te worden.

Resumerend ziet de toekomst voor de ontwikkeling, commercialisering en teelt van genetisch gemodificeerde siergewassen binnen de Europese Unie er op dit moment (nog steeds) niet rooskleurig uit.

2. INLEIDING

Genetische modificatie is een techniek die grote mogelijkheden biedt om gewassen te verbeteren, maar de acceptatie door de consumenten van z.g. gentechgewassen is in Europa nog onvoldoende en introductie in het milieu is aan strenge Europese regelgeving onderworpen. Met introductie in het milieu wordt bedoeld import, teelt, verwerking of directe verkoop/veiling. Om toestemming van de EU te verkrijgen voor introductie in het milieu dient de aanvrager of producent van het specifieke gentechgewas veel gegevens aan te leveren die te maken hebben met aspecten van veiligheid voor mens en dier en voor het milieu. De kosten die met de gehele procedure gemoeid zijn, worden geschat te kunnen oplopen tot 6 miljoen euro, al is niet precies bekend hoe dit getal tot stand is gekomen. Het grootste deel van deze kosten is gelegen in voedselveiligheidsbepalingen via dierproeven. Herevaluatie van de regelgeving is in Europa gaande op dit moment, ingegeven door nieuwe ontwikkelingen die resulteren in nieuwe categorieën gentechgewassen. Ook lijkt er een verbetering in de acceptatie door de consument plaats te vinden in sommige Europese landen afhankelijk van het gewas, de eigenschap en de producent.

De genoemde kosten zijn voor een willekeurig siergewas niet op te brengen, maar zoals gezegd, het idee bestaat dat de kosten voor siergewassen hoogstwaarschijnlijk niet van een dergelijke grootte zijn, daar de meeste siergewassen niet zullen worden gegeten door mens noch dier. Belangrijk is te weten aan wat voor eisen de nieuwe gentech siergewassen moeten voldoen om productie en vermarkting in Europa en daarbuiten mogelijk te maken en welke kosten daaraan verbonden zijn. Een precedent bestaat al; Suntory heeft via de lidstaat Nederland toestemming aangevraagd voor import en verkoop in Europa van transgene anjers; 2 cultivars zijn al toegelaten, de aanvraag voor 2 andere is hangende.

Het doel van de voorloper (PT13973) van dit project was te weten te komen wat voor eisen het Ministerie van Infrastructuur en Milieu via Bureau GGO en namens de EU stelt aan gentech siergewassen bij de z.g. *“Introductie in het milieu en in de markt” t.b.v. teelt, import en handel/verwerking*. De conclusies waren dat de aanname dat gentech siergewassen makkelijker en sneller door de EU-regelgeving heen zouden komen en de markt zouden kunnen bereiken ongegrond was. Er is geen sprake van categorieën GM gewassen met elk een aparte evaluatie. Elke casus wordt op zich zelf volgens voor elk gewas vaste criteria bekeken. Er bleek geen aanvraagformulier voor *marktintroductie* van gentech (sier)gewassen, maar slechts een samenvattingsformulier en de concrete informatievereisten zijn onduidelijk. Er werd verwezen naar de aanvraag zoals ingediend door Suntory (voorheen Florigene) als voorbeeld. Als dat gevolgd zou moeten worden, dan zouden de kosten van zo'n aanvraag te hoog oplopen voor een siergewas en zou de looptijd van de aanvraag te lang zijn gezien de omlooptijd van rassen in de siersector. In verband met de geconstateerde vaagheid in criteria die voor een marktintroductie gelden, werd gesuggereerd om het hele traject vanaf het begin te doorlopen te beginnen met een *aanvraag voor een veldproef categorie 1*. Normaal volgen daarna een veldproef categorie 2, 3 en dan de aanvraag voor marktintroductie. Door dit traject vanaf het begin te doorlopen zal duidelijk moeten worden wat precies wanneer gevraagd wordt aan informatie om het volgende stadium te kunnen ingaan. Dit project omvat het opstellen van een aanvraag veldproef categorie 1 voor lelies als voorbeeld siergewas waarin m.b.v. genetische modificatie genen zijn geïncorporeerd die resistentie tegen luizen moeten geven. Deze aanvraag is vervolgens besproken met het Bureau GGO en leden van het COGEM secretariaat om te zien of de aanvraag voldoet aan de criteria om een vergunning te verkrijgen van het Ministerie van Infrastructuur en Milieu en om te identificeren wat voor informatie er nodig is om te zijner tijd een aanvraag categorie 2 of 3 te kunnen doen. Dit moet een beeld geven van de daarmee gemoeide kosten en tijd en dus een antwoord op de vraag of marktintroductie van gentech siergewassen een commercieel levensvatbare optie.

3. RESULTATEN

3.1 Afbakening fase 1

Het oorspronkelijke projectvoorstel omvatte 3 fasen.

1. Het invullen van het aanvraagformulier "Introductie in het Milieu: Planten" van het Ministerie van I&M t.b.v. een aanvraag voor een veldproef categorie 1. Als concrete casus zullen de transgene of merker-vrije genetisch gemodificeerde lelies dienen die resistent tegen bladluizen zijn na introductie van een tweetal genen. Deze lelies zijn geproduceerd in het kader van project PT12966 en gekarakteriseerd in het vervolg daarop, PT14587. Uit die projecten zullen de gegevens komen van de moleculaire en resistentie analyses die nodig zijn voor de aanvraag. Die gegevens komen in 2012 (moleculair) en mogelijk 2013 (resistentie) beschikbaar. In deze fase 1 zal een concept opgesteld worden met zoveel mogelijk informatie. Dit zal in het laatste kwartaal van 2012 worden opgestuurd naar BureauGGO en voor eind 2012 worden besproken.
2. Het commentaar van BGGO zal worden verwerkt en nog ontbrekende gegevens zullen worden toegevoegd (bijv. resistentietoets-gegevens) om te komen tot een definitieve aanvraag, die uiterlijk in de loop van het eerste kwartaal van 2013 ingediend zal worden. In de aanloop naar een voorlopige beschikking kan er aanvullende informatie worden gevraagd door het Ministerie of BGGO n.a.v. het advies van de Commissie Genetische Modificatie (COGEM). Dit zal dan aangeleverd worden. Na de terinzagelegging kan het zijn dat er bezwaren worden ingediend tegen de voorlopige beschikking. Het ministerie bekijkt de bezwaren en geeft daar een reactie op. Die reactie wordt opgenomen in de definitieve beschikking. Alleen bezwaarmakers uit de eerste ronde kunnen dan naar de Raad van State stappen als zij willen om te proberen om de beschikking vernietigd te krijgen.
3. Acties die in dit laatste deel van het proces nodig mochten blijken te zijn om ervoor te zorgen dat de beschikking onherroepelijk wordt vallen niet binnen fase 2, maar binnen een fase 3. Te denken valt bijvoorbeeld aan inzet nodig voor het beantwoorden van vragen van de Stichting Advisering Bestuursrechtspraak (Stab, het adviesorgaan voor de RvS) en voor hulp bij het opstellen van een pleitnotitie door juristen van het Ministerie van I&M t.b.v. een zitting van de RvS.

Bij de toekenning van dit project is door het Productschap Tuinbouw besloten om alleen fase 1 te honoreren. Deze rapportage betreft dus alleen fase 1, opstellen concept en bespreken met BGGO. Het daadwerkelijk formeel indienen van de veldproefaanvraag, het werken aan het verkrijgen van een positieve beschikking en het inrichten van de veldproef zijn binnen dit project niet aan de orde.

3.2 Concept aanvraag veldproef categorie 1

De conceptaanvraag introductie in het milieu, veldproef categorie 1, betreft genetisch gemodificeerde lelies als model voor een gentech siergewas. De gentech lelies zijn merker-vrij, dat wil zeggen dat er geen selectiegenen (meer) aanwezig zijn en alleen maar de doelgenen. Dit zijn een tweetal genen, die er op gericht zijn om de lelies resistent te maken tegen bladluizen, die weer de vector zijn voor de overdracht van virussen. Het ene gen zorgt voor de aanmaak van een vluchtige stof, linalool, die als repellent werkt. Dit gen komt uit aardbei. Het andere gen zorgt voor de aanmaak van een eiwit dat in het darmstelsel van de luizen de afbraak van eiwitten remt en daarmee hun groei en vruchtbaarheid. Dit gen komt van een zeeanemoon. Samen moeten zij de populatieopbouw afremmen en uiteindelijk minder symptomen en schade (virus) geven. Deze casus is als voorbeeld gekozen omdat de productie van liehebollen in de open lucht en in de grond plaatsvindt en omdat de doelstelling een milieuvriendelijke is, namelijk het terugdringen van het gebruik van gewasbeschermingsmiddelen. Een andere casus die in de siersector goed denkbaar zou zijn is een gewas dat meer afgesloten in kassen wordt geteeld en als eigenschap een wijziging in kleur of vorm heeft gekregen (puur esthetisch). Dat de gekozen eigenschap een belangrijk effect kan hebben op de eisen voor aanvullende informatie en daarmee op de kosten zal later blijken (zie 3.3.).

De aanvraag zoals ingediend en besproken is weergegeven in bijlage 1.

3.3 Commentaar BGGO en COGEM

Aangezien het geen formele indiening van een aanvraag betrof maar ‘slechts’ een concept, was het niet mogelijk een formeel advies van de subcommissie landbouw van de COGEM, de Commissie Genetisch Modificatie, over deze casus te verkrijgen. Wel waren diverse mensen binnen het Bureau GGO en het secretariaat van de COGEM bereid om het concept door te nemen en te becommentariëren als was het een gewone aanvraag, waarvoor ik hen dank verschuldigd ben. Hun commentaar is in een persoonlijk onderhoud besproken en een weergave van de essentiële punten volgt hieronder. De punten zijn onderverdeeld in relevant voor de aanvraag categorie 1 en relevant voor een eventuele aanvraag categorie 2 of meer.

3.3.1 Categorie 1

De algemene indruk van de conceptaanvraag was dat hij goed verzorgd was en bijna volledig voldeed aan de eisen. Bij sommige onderdelen was de geleverde informatie meer dan voor een categorie 1 aanvraag noodzakelijk is, maar dit betekent niet dat die informatie in alle gevallen verwijderd hoeft te worden. Bij enkele andere punten was nog aanvullende informatie nodig.

- A.7. Als er later een toelating zou zijn voor marktintroductie dan mogen de toegelaten cultivars gekruist worden met niet-gentech lelies om nieuwe cultivars te maken op voorwaarde dat dit expliciet en tijdig in het aanvraagtraject is aangevraagd. Een marktintroductie van die nieuwe cultivars hoeft dan niet opnieuw het hele proces van vergunningaanvraag te doorlopen.
- B.2. Het bestaan van de ‘roggelelie’ en het feit dat die voorkomt in Nederland, ook al is het zeer zeldzaam in het Drents district, moet ook vermeld. De *Lilium bulbiferum* subsp. *croceum* is taxonomisch ondergebracht in de sectie *Liriotypus* en dat is een andere sectie dan die waar de Oriental hybrids uit voortkomen. Geen uitgangsplantensoort dus, dat laatste moet dan wel benadrukt worden.
- B.10. Hier moet ook zaad als overlevingsstructuur genoemd worden, maar alleen in geval van bloei.
- **B.12.** Informatie die uit de categorie 1 veldproef moet komen is de mate waarin opslag optreedt na het beëindigen van de proef en hoeveel herbicide behandelingen nodig zijn.
- B.15. De bewering dat lelies niet populair zijn bij bestuivende insecten moet hard gemaakt worden door bijvoorbeeld literatuurgegevens. ‘Niet populair’ houdt dus in dat het in principe wel kan! Aangezien bij deze veldproef categorie 1 geen sprake zal zijn van ‘laten doorgroeien’ hoeft deze passage hier niet; wel later bij een categorie 2 of 3.
- **B.17.** In geval van mogelijke overleving moet aangegeven worden wat de kans daarop is en hoe lang de structuur kan overleven. Dit soort gegevens moeten of in de categorie 1 veldproef verkregen worden of moeten, liefst gedocumenteerd, uit de praktijk bekend zijn.
- C.5. Voor een categorie 1 aanvraag is meer informatie gegeven dan nodig. Voor een categorie 2 aanvraag is het wel in orde.
- D.1. – D.11. Voor een categorie 1 aanvraag is dit voldoende, maar niet voor een categorie 2 aanvraag.
- D.12 – D.17; D.20. - D.21; D.25. – D.26. De verwachting voor de genoemde fenomenen is ‘geen effect’ en hier moet dus simpel met ‘nee’ geantwoord worden. Informatie hierover verkrijgen in de categorie 1 veldproef is niet nodig!
- D.19. Voor de categorie 1 aanvraag is dit wederom voldoende, niet voor een categorie 2 aanvraag.
- E. Voor categorie 1 voldoende.
- F.2. Geef ook hier zo veel mogelijk informatie over het werkingsmechanisme als dat bekend is. Wat er bekend is staat reeds vermeld bij D.19. maar kan hier herhaald worden, liefst zo specifiek voor equistatine als mogelijk.

3.3.2 Categorie 2 of meer

- B.15. Als er sprake is van laten doorgroeien tot bloei, moet dat nu (categorie 2) hier vermeld worden, plus de consequenties voor bestuiving en zaadzetting.
- B.20 – B.23. Bij deze onderdelen moet de onderverdeling van het geslacht *Lilium* in secties aangegeven worden en hoe de onderlinge kruisingsmogelijkheden liggen inclusief in geval van toepassen van embryo rescue. Literatuurreferenties indien aanwezig zijn gewenst.

- **D.1. – D.11.** Voor een veldproef categorie 3 aanvraag is het nodig de flankerende regio's, d.w.z. de overgangen tussen het lelie-DNA en het nieuw ingevoegde T-DNA te sequencen. Ook dient het precieze aantal T-DNA insertie kopieën bepaald te worden. De EFSA (European Food Safety Authority) stelt hiervoor Southern blots verplicht, d.w.z. voor marktintroductie zijn Southern's nodig. Vanwege de enorme grootte van het genoom is dit in lelie problematisch. Alternatieven zijn voor Nederland acceptabel, maar vooralsnog niet voor de EU (EFSA). Voor een categorie 3 en marktintroductie aanvraag zullen er ook gegevens over de expressie en over de aanwezige/geproduceerde hoeveelheden linalool en equistatine moeten zijn, een kwantitatieve analyse dus m.b.v. biochemische technieken en Westerns of ELISAs.
- **D.19 & D.24.** Voor een categorie 2 aanvraag moeten meer bewijzen aangeleverd worden voor de bewering dat er geen sprake is van effecten op zoogdieren en mensen. Ook moet er gekeken worden naar effecten op insecten die geen plaag zijn, maar mogelijk toch getroffen worden. De suggestie werd gedaan om in het lab of in de kas proeven te doen op vertegenwoordigers van 5 functionele insectengroepen, zoals bijvoorbeeld loopkevers, lieveheersbeestjes, gaasvliegen, vlinders, roofmijten, wolfspinnen (laatste twee formeel geen insecten maar geleedpotigen). Voor een categorie 3 en marktintroductie aanvraag moet ook het effect op bodem(micro)organismen bekeken worden.
- **E.21.** De vraag werd gesteld wat er in geval van groei na het oogsten van de stelen gebeurt met het restafval? Om die vraag te beantwoorden moet het duidelijk zijn dat het veilig is om dat afval te composteren of op het veld uit te rijden. Daarvoor is meer informatie nodig, zie volgende punt.
- **E.21.** De vraag hoe snel equistatine in de bodem wordt afgebroken zal voor een categorie 2 aanvraag beantwoord moeten worden. Als die gegevens niet uit literatuur of uit andere landen bekend zijn, dan moet de afbraaksnelheid van equistatine gemeten worden voordat de categorie 2 aanvraag ingediend kan worden. De vraag is bij welk item (E.18.- E.21?) die informatie dan gegeven kan worden.

3.3.3 Overig

Aangegeven werd dat er bij gentech siergewassen in vergelijking met gentech voedsel- of veevoergewassen geen noodzaak was tot het doen van voedingsproeven, dat samenstellingsgegevens niet nodig zijn, maar dat het bestuderen van de effecten op niet-doelwit organismen onverkort gehandhaafd blijft omdat het uiteindelijke doel ook de teelt van siergewassen betreft en niet alleen import. Dat laatste betrof dan ook met name de aangeleverde casus, waarin een uit een dier en niet uit een plant afkomstig eiwit gebruikt wordt met een breed en aspecifiek werkingsspectrum. Opgemerkt werd dat een casus met een wijziging in bloemkleur via in planten bekende stoffen en daarvoor coderende genen minder aanvullend onderzoek zou vergen, zoals afbraaksnelheid of effect op niet-doelwit organismen. Hierbij valt bijvoorbeeld te denken aan wijzigingen in aard en hoeveelheid van de typen anthocyanen, kleurstoffen die in planten en bloemen ruimschoots aanwezig zijn, zoals gedaan is bij de gentech anjers van Suntory (zie omslag), de enige siergewassen die in de EU zijn toegelaten voor import en verkoop.

4. CONCLUSIES

- De in bijlage 1 weergegeven concept aanvraag veldproef categorie 1 voor merker-vrije gentech lelies uitgerust met genen gericht op bladluisresistentie zou met enkele kleine aanpassingen geschikt zijn voor daadwerkelijke indiening ter verkrijging van een vergunning om een veldproef te beginnen.
- Voor een aanvraag veldproef categorie 2 zou de volgende aanvullende informatie nodig zijn:
 1. In welke mate treedt er opslag op en hoeveel applicaties van herbiciden zijn nodig om die volledig tegen te gaan? (uit categorie 1)
 2. Wat is de kans op overleving van achterblijvende bollen en hoe lang kunnen zij overleven? (uit categorie 1)
 3. Wat is het effect op niet-doelwit organismen? Test het effect in kas of lab op vertegenwoordigers van 5 functionele insectengroepen. (uit nader onderzoek en uit veldproef categorie 1)
 4. Hoe snel wordt het eiwit equistatine afgebroken in de bodem? (uit nader onderzoek)
- Voor een aanvraag veldproef categorie 3 en marktintroductie zou daarbovenop nog nodig zijn aan aanvullende informatie:
 1. Hoeveel kopieën van het T-DNA zijn er in het genoom van de individuele gentech lelielijnen ingebouwd? (uit nader onderzoek WUR Plant Breeding)
 2. Southern blot als bewijs van kopie-aantal.
 3. Hoe zien de overgangen er uit op DNA basenvolgorde niveau tussen het leliegenoom en het T-DNA? (uit nader onderzoek PB)
 4. Western blot of ELISAs ter kwantificering van de expressie en eiwitniveaus voor equistatine; biochemische analyse t.b.v. kwantificering linalool.
 5. Bestudering van het effect op bodem(micro)organismen.
- Een deel van de aanvullende informatie kan wanneer die eenmaal verkregen is direct weer hergebruikt worden bij andere aanvragen voor gewassen met dezelfde geïntroduceerde genen. Dit zal daar de kosten en tijd drukken.
- De totale kosten voor een marktintroductie van een gentech siergewas zullen lager zijn dan voor een voedsel- of veevoedergewas want:
 - Voedingsproeven zijn niet nodig in geval van gentech siergewassen
 - Samenstellingsbepalingen zijn niet nodig in geval van gentech siergewassen
- Het extra onderzoek noodzakelijk voor de aanvragen veldproef categorieën 2 en 3 en voor de marktintroductie, zoals in deze casus naar overleving bollen, afbraaksnelheid equistatine in de bodem en vooral de effecten op niet-doelwit organismen brengt zoveel extra kosten met zich mee dat het totale traject economisch niet haalbaar is voor een individueel ras in een specifiek siergewas.
- Voor gentech siergewassen gemodificeerd qua bloemkleur of rood blad (gevariegeerd) of plantvorm met behulp van stoffen die reeds in planten bekend zijn, zoals cyanidine of plantengroeiregulatoren zijn minder aanvullende proeven nodig en daarmee zullen de totale kosten lager zijn.
- De termijn nodig om het noodzakelijke traject van veldproeven categorie 1, 2 en 3 en aanvraag en afhandeling van een marktintroductie bedraagt meer dan 3 (drie) jaar en is (te?) lang en onzeker.
- Kruisen van niet GGOs met eenmaal goedgekeurd gentech materiaal van dezelfde soort mag en de kruisingsproducten hoeven niet opnieuw aan de toelatingsprocedure onderworpen te worden.

Resumerend ziet de toekomst voor de ontwikkeling, commercialisering en teelt van genetisch gemodificeerde siergewassen binnen de Europese Unie er op dit moment (nog steeds) niet rooskleuring uit.

5. BIJLAGE I.

Lelies met luisresistentie, concept aanvraag



Ministerie van Infrastructuur en Milieu

AANVRAAGFORMULIER INTRODUCTIE IN HET MILIEU:

PLANTEN

Indien u vragen heeft kunt u contact opnemen met Bureau GGO (email: bggo@rivm.nl, telefoon: 030-2742793).

Alle gevraagde gegevens op dit formulier zijn openbaar. Vertrouwelijke informatie dient in een aparte bijlage meegezonden te worden.

De specifieke persoonsgegevens van de contactpersoon en milieuveiligheidsfunctionaris dienen te worden aangeleverd door middel van de verplichte bijlage 2. In deze bijlage aangeleverde gegevens zullen vertrouwelijk worden behandeld en dus niet aan het publiek kenbaar gemaakt worden uit oogpunt van de Wet bescherming persoonsgegevens.

Het aanvraagformulier omvat vragen die mogelijk niet van toepassing zijn voor uw aanvraag. U wordt vriendelijk verzocht de onderdelen die geen betrekking hebben op de aan te vragen werkzaamheden NIET in uw aanvraag op te nemen.

Aandachtspunten bij indiening van het formulier:

- Literatuur waarnaar verwezen wordt in de aanvraag dient met het aanvraagformulier meegezonden te worden.
- Vertrouwelijke informatie dient als vertrouwelijk gekenmerkt te worden en apart aangeleverd.
- Een ingevuld SNIF B formulier (Engelstalig invullen) dient in Word format elektronisch aangeleverd te worden.

INTERNET www.bggo.rivm.nl

AFKORTINGEN

Regeling	Regeling genetisch gemodificeerde organismen
ggo	Genetisch Gemodificeerd Organisme
ggp	Genetisch Gemodificeerde Plant

INHOUDSOPGAVE

A.	Algemene gegevens	3
	Doel van de introductie in het milieu	4
	Vergunningaanvrager	4
B.	Gegevens over de uitgangsplantensoort	4
	Naam van de uitgangsplantensoort	4
	Geografische verspreiding	5
	Voortplanting	5
	Overleving	6
	Verspreiding	6
	Uitkruising	7
	Interacties met andere organismen	7
	Identificatiekenmerken	8
C.	Algemene gegevens over de genetische modificatie	8
	Eerdere of meerdere modificaties	8
	Algemene gegevens over de genetische modificatie	8
	DNA dat gebruikt is om de plant te modificeren	8
D.	Gegevens over de genetisch gemodificeerde plant (ggp)	10
	Geschiedenis	11
	Eigenschappen	11
	Insertie 11	
	Expressie	12
	Verschillen van het ggp en eventuele uitkruisingsproducten ten opzichte van de uitgangsplantensoort	12
E.	Gegevens over de voorgenomen introductie in het milieu	14
	Locatie 14	
	Ecosysteem	15
	Opzet van experiment en introductie	16
	Vervoer	16
	Na afloop van het experiment	16
F.	Analyse van de te verwachten effecten van de ggp op mens en milieu	17
G.	Voorgestelde maatregelen voor inperking en risico management	19
H.	Voorgestelde methoden van observatie tijdens en na afloop van het experiment	20

A. Algemene gegevens

A.1. Titel van de aanvraag

Lelies met luisresistentie

A.2. Geef een korte inhoudelijke beschrijving van de aanvraag.

Kleinschalige proef met genetisch gemodificeerde leliebollen en –planten. Het betreft verschillende leliecultivars die allen met hetzelfde genconstruct zijn gemodificeerd. De genen coderend voor linalool synthase (LS) en equistatine (EQ) geven resistentie tegen luizen zoals de groene perzikluis en de katoenluis. Het vluchtige linalool dient als repellent en de proteïnase remmer equistatine zorgt na ingestie voor het onvoldoende beschikbaar komen van aminozuren zodat de groei en ontwikkeling stagneren. Populatieopbouw wordt zo voorkomen. Of en in hoeverre dit ook in een veldsituatie opgaat, is het onderzoeksdoel van deze veldproef. Het ultieme doel is op deze manier virusinfecties tegen te gaan en de schade die deze met zich meebrengen. Chemische bestrijding zal dan teruggebracht kunnen worden. De bij de genetische modificatie benodigde selectiegenen voor antibioticum resistentie zijn na gebruik verwijderd door excisie m.b.v. recombinatie en dus niet meer in de lelies aanwezig. Hiervoor is het op Plant Research International ontwikkelde merkervrije systeem gebruikt.

A.3. Geef een beschrijving van de voorgenomen werkzaamheden.

Antwoord: De werkzaamheden zullen beginnen met het plantklaar maken van het proefperceel. Dit houdt in ploegen, egaliseren en bemesten (NPK) van het perceel tenminste 14 dagen voor de plantingsdatum. Er zal een plantschema gemaakt worden met een indeling in bedden. De rijen in de bedden hebben een lengte van 80-100 cm, de afstand tussen de rijen is 30 cm en de plantafstand van de bollen in de rij bedraagt ongeveer 10 cm. Voor het planten worden de bollen ontsmet met in de bollenteelt gebruikelijke en toegelaten middelen tegen schimmels. De bolmaat van de bollen wordt bepaald en de bollen worden vervolgens geplant. De bedden worden afgegaasd, d.w.z. er wordt een omheining van gaas opgesteld tegen reeën, konijnen en hazen. Onkruid zal bestreden worden op een in de gangbare lelieteelt gebruikelijke wijze. Als het gewas halfhoog is zal er worden begonnen met wekelijkse bespuitingen tegen *Botrytis elliptica*, dit tot na het koppen. Normaal in de teelt is ook dat er tegen luizen gespoten wordt, maar hier dus in eerste aanleg niet. Het planten gebeurt in maart/april, koppen eind juli en rooien november. Het afrijpen, d.w.z. het afsterven van loof en stengels, vindt vanzelf plaats rond oktober. Na het rooien worden de bollen gespoeld en ontsmet, in zakken gedaan en opgeslagen bij +1 °C in de koelcel.

A.4. Geplande aanvangsjaar.

Antwoord: 2013

A.5. Verwachte eindjaar.

Antwoord: 2018

A.6. Geef aan of er consumptie-experimenten of voedereperimenten plaatsvinden.

Antwoord: Neen

A.7. Geef aan of ook kruisingsproducten tussen de aangevraagde GGP's en niet-gemodificeerde planten deel uitmaken van de aangevraagde werkzaamheden.

Antwoord: Neen

A.8. Tot welke categorie behoort de aangevraagde veldproef volgens het advies van de COGEM van 25 november 2008, CGM/081125-02: Herziening advies indeling veldwerkzaamheden met genetisch gemodificeerde planten?

Antwoord: Categorie 1; kleinschalige veldwerkzaamheden met inperkende maatregelen. De proef zal tot 1 (één) locatie beperkt zijn, welke kleiner is dan 1 hectare.

- A.9. Wilt u informatie vertrouwelijk houden? Zo ja, geef een motivering die concreet aangeeft welke nadelige gevolgen openbaarmaking van deze informatie voor uw concurrentiepositie heeft.
Antwoord: Neen

Doel van de introductie in het milieu

- A.10. Specifiek doel van de werkzaamheden die worden aangevraagd.
Het testen van de effectiviteit van de geïntroduceerde genen in het verschaffen van resistentie tegen bladluizen aan de GM lelies in vergelijking met de non-GM lelie controles in een veldsituatie. Het produceren van bloeibare bollen. Doel is virusoverdracht te verminderen.
- A.11. Algemeen doel van de werkzaamheden die worden aangevraagd.
Algemeen doel is insectenresistentie te introduceren in moderne leliecultivars die zelf commerciële waarde hebben, maar ook geschikt zijn om als kruisingsouder te dienen voor verder te ontwikkelen materiaal, i.e. nieuwe cultivars. Door de luisresistentie zal virusoverdracht worden tegengegaan en zullen er minder chemische bestrijdingsmiddelen hoeven worden ingezet in de lelieteelt. Deze categorie 1 veldproef zal ook antwoorden moeten verschaffen op vragen die gesteld worden in een categorie 2 aanvraag.
- Secundair doel is om via deze aanvragen een beeld te krijgen over de (on)mogelijkheden om GM siergewassen in Nederland op commerciële schaal te telen en op te markt te introduceren. Het gaat hierbij om de tijd die nodig is voor het proces van vergunningverlening in EU-verband en om de kosten die gemoeid zijn met dossieropbouw en informatieverwerving. Inzicht in duidelijke minimale eisen die van overheidswege worden gesteld, is dringend gewenst.

Vergunningaanvrager

- A.12. Naam Rechtspersoon.
Stichting DLO / onderdeel Plant Research International/ Praktijkonderzoek Plant en Omgeving.
Adres.
Droevendaalsesteeg 1 (Postbus 16)
Postcode en plaats.
6708 PB (6700 AA) Wageningen

B. Gegevens over de uitgangsplantensoort

Naam van de uitgangsplantensoort

- B.1. Gangbare Nederlandse naam.
Antwoord: Lelie
Familie.
Antwoord: Liliaceae
Geslacht.
Antwoord: Liliaceae
Sectie.
Antwoord: Archelirion
Divisie.
Antwoord: Oriental hybriden
Soorten bijdragend aan de 'Oriental' hybriden
Antwoord: Dit betreft vooral *L. auratum* en *L. speciosum*. In veel mindere mate *L. platyphyllum*, *L. brownii*, *L. nobilissimum*, *L. rubellum* en *L. japonicum*
Cultivar/teeltlijn.
Antwoord: 'White Express'; 'Lake Carey'; 'Cherbourg'; 'Sheila'; 'Paradero'; 'Robina', waarbij deze laatste een hybride (OT) is tussen een Oriental en een Trumpet (andere divisie met hybriden van soorten als *L. henryi*, *L. regale* en *L. aurelianse*)

Geografische verspreiding

- B.2. In welke systemen, buiten agrarische systemen, komt de uitgangsplantensoort voor in Nederland?
Antwoord: De soorten bijdragend aan de Oriental hybriden van de sectie Archelirion komen niet in Nederland voor, net zomin als de soorten die bijdragen aan de hybriden van de Divisie Trumpet. De Oriental hybriden en Trumpet hybriden zelf zijn kunstmatig verkregen en kennen geen natuurlijk voorkomen en verspreidingsgebied. Het herkomstgebied van de oorspronkelijke soorten ligt in China en Japan.
- B.3. In welke systemen, buiten agrarische systemen, komt de uitgangsplantensoort voor in omliggende landen van Nederland?
Antwoord: De soorten bijdragend aan de Oriental hybriden van de sectie Archelirion komen niet in omliggende landen van Nederland voor, net zomin als de soorten die bijdragen aan de hybriden van de Divisie Trumpet. De Oriental hybriden en Trumpet hybriden zelf zijn kunstmatig verkregen en kennen geen natuurlijk voorkomen en verspreidingsgebied.
- B.4. In welke typen agro-ecosystemen wordt de uitgangsplantensoort geteeld?
Antwoord: De teelt van lelies vindt voor de helft plaats op droge, waterdoorlatende zandgronden, vnl. Bollenstreek, Kennemerland en Noordelijk Zandgebied en voor de helft op klei, vnl. West-Friesland en Flevoland in de volle grond, akkers. Daarnaast ook verspreid in de provincies Friesland, Drenthe, Overijssel en Limburg. Het betreft in totaal ongeveer 4200 hectaren. Daarnaast worden t.b.v. de productie van snijbloemen lelies in speciale kassen geteeld (broeien).
- B.5. In welke typen (agro-)ecosystemen wordt de uitgangsplantensoort verder aangetroffen?
Antwoord: In particuliere tuinen bij woningen.

Voortplanting

- B.6. Wat zijn de wijzen van voortplanting van het gewas in haar natuurlijke habitat en welke factoren zijn hierop van invloed?
Antwoord: Zoals onder B.3 aangegeven zijn de Oriental en Trumpet hybriden kunstmatig en kennen zij geen natuurlijke habitat.
- B.7. Wat is de wijze van voortplanting van het gewas in het agro-ecosysteem waarin het wordt geteeld en welke factoren zijn hierop van invloed?
Antwoord: In principe vindt er bij de teelt geen voortplanting plaats. Bollen worden in het voorjaar geplant. De planten worden net als tulpen gekopt voor de bloei, in juli. Het gaat bij de teelt om de productie van bollen en na het kopen kan de plant alle voedingsstoffen stoppen in de aanleg en groei van bollen. Die bollen worden tenslotte geoogst in het najaar tussen half oktober en begin december. Soms wordt een deel van de bloemen niet gekopt en wordt bloei dat jaar gebruikt om van de bloemen de cultivar-echtheid te kunnen bepalen. Lelies zijn zelf-incompatibel en kunnen zich zelf dus niet bestuiven en bevruchten. Zaadzetting zal niet plaatsvinden in de teeltgebieden.
- B.8. Wat is de generatietijd van het gewas in haar natuurlijke habitat en welke factoren zijn hierop van invloed?
Antwoord: Zie B.3
- B.9. Wat is de generatietijd van het gewas in het agro-ecosysteem waar het geteeld wordt en welke factoren zijn hierop van invloed?
Antwoord: In de veredeling, waar men door bestuiven en bevruchten gericht is op zaadzetting, levert een zaadje na uitplanten na twee tot drie jaar een bloeibare bol op. Bij de teelt worden de bollen in het najaar gerooid en worden de grote, de 'leverbare' bollen, bestemd voor de verkoop en de kleine bollen dienen als plantgoed voor het jaar erna. "Schubben" is een aparte vermeerderingsmethode, waarbij de schubben,

waaruit de bol is opgebouwd, worden losgemaakt. Die schubjes, waarop zich nieuwe bolletjes kunnen vormen, kunnen ook als plantgoed worden gebruikt.

Overleving

- B.10 Welke overlevingsstructuren worden gevormd en welke factoren zijn hierbij van invloed?
Antwoord: De leliebollen zijn als overlevingsstructuren te beschouwen en zijn het product waar het bij de teelt om gaat.
- B.11 Wat is de persistentie van de overlevingsstructuren van het gewas in haar natuurlijke habitat en welke factoren zijn hierbij van invloed?
Antwoord: Er is geen sprake van een natuurlijke habitat voor de lelie-hybriden (zie B.3). Lelies zijn meerjarige gewassen vanwege de bollen als overlevingsstructuren en daarmee dus persistent. Of en hoe lang de bollen overleven hangt o.a. af van de wintertemperaturen, van bolziekten zoals *Fusarium*, maar ook van vraat door insecten zoals het leliehaantje en door zoogdieren (konijnen) bij uitlopen in het voorjaar.
- B.12 Wat is de persistentie van de overlevingsstructuren in het agro-ecosysteem waar het gewas in Nederland geteeld wordt en welke factoren zijn hierbij van invloed?
Antwoord: De overlevingsstructuren zijn de bollen. Deze zijn ook het oogstbare product en worden dus zo veel mogelijk uit het teelt agro-ecosysteem verwijderd. Dit rooien vindt plaats in het najaar, tussen half oktober en begin december. Een deel van de achterblijvende bollen zal door het rooien beschadigd zijn en niet levensvatbaar; de rest zal persistent zijn en afhankelijk van wintertemperaturen, ziekten en vraat terug kunnen komen. Bij teelt wordt vaak rotatieteelt toegepast en in ieder geval wordt voor het planten van het volgende gewas (of teelt) en na het bewerken van het land het perceel gecontroleerd op overblijvers die vervolgens "bestreken" worden met onkruidbestrijdingsmiddel. Na grondbewerking zal niets van de bol overblijven.
- B.13 Wat is de mogelijkheid tot overleving van het gewas in Nederland buiten het agro-ecosysteem?
Antwoord: Als een bol buiten het agro-ecosysteem belandt, dan is het voor overleving van belang dat hij onder de grond terecht komt en dan bij voorkeur in grond met een hoge vochtdoorlaatbaarheid. Dan, weer afhankelijk van wintertemperatuur, ziekten en vraat, kan hij nieuw blad en een bloemstengel aanleggen na een rustperiode. In de praktijk blijkt dat bollen niet tot nauwelijks tot vestiging buiten de teeltgebieden leiden vanwege beschadiging van de bol maar meestal door het verdwijnen o.i.v. aantasting door het leliehaantje of door *Fusarium*. Dit geldt ook in tuinen waar overhouden langer dan 2 jaar niet plaatsvindt.
- B.14 Wat is de mogelijkheid tot overleving van het gewas in de omliggende landen buiten het agro-ecosysteem?
Antwoord: Zie B.13. Naar mate de winters gemiddeld strenger zijn in die omliggende landen zal de overleving minder zijn.

Verspreiding

- B.15 Welke verspreidingsstructuren worden gevormd en welke factoren zijn hierbij van invloed?
Antwoord: De verspreidingsstructuren zijn bollen, bolletjes, pollen en zaden. Bollen en bolletjes (de kleine bolletjes die op schubben worden gevormd en die voor vermeerdering zorgen en voor plantgoed voor het volgende jaar, zie B.9) zijn al behandeld bij B.10 tot en met B.14. Stuifmeel wordt alleen gevormd bij bloei en dit gebeurt in speciale kassen onder specifieke omstandigheden (broei). Het in deze aanvraag bedoelde agro-ecosysteem betreft de volle grond en daar worden de bloemen gekopt voor opengaan. Vorming van en verspreiding via stuifmeel zullen dus niet plaatsvinden, tenzij een teler ter bevestiging van de rasechtheid een aantal planten laat doorgroeien. Het stuifmeel is vrij zwaar en lelies zijn niet populair bij bestuivende insecten, zoals vliegen en bijen. Bestuiving in de praktijk vindt sporadisch plaats als er sprake is van bloei en iemand door het gewas is gelopen of bij harde wind. Lelies zijn zelf-incompatibel en kunnen zich zelf dus niet bestuiven en bevruchten. Zaadsetting zal feitelijk niet plaatsvinden in de teeltgebieden.
- B.16 Wat is de overleving van verspreidingsstructuren van het gewas in haar natuurlijke habitat en welke factoren zijn hierbij van invloed?

Antwoord: Geen natuurlijke habitat, zie B.3

- B.17 Wat is de overleving van verspreidingsstructuren in het agro-ecosysteem waar het in Nederland geteeld wordt en welke factoren zijn hierbij van invloed?

Antwoord: Leliestuifmeel blijft gedurende een periode van één tot twee weken levensvatbaar bij omgevingstemperaturen tussen de 4° en 20 °C en bij een lage luchtvochtigheid, afhankelijk van de cultivar. Van vitaal belang is de vochtigheid, bij een beetje regen is 0% vitaal binnen 1 dag, bij sommige cultivars binnen 1 uur. Bij droog en koel bewaren kunnen leliezaden zeker tien tot twintig jaar hun kiemkracht behouden. In het agro-ecosysteem vindt geen zaadsetting plaats bij Oriental hybriden. Voor kieming zijn speciale condities nodig, zoals stratificeren of speciaal geprepareerde kiembedden. Vogels en woelmuizen kunnen dan het aantal uitdunnen. Spontane kieming in het wild komt nauwelijks voor. Overleving van bollen treedt niet op door het eerder genoemde "bestrijken" van overblijvers en door beschadigingen bij het rooien en door aantasting door ziekten en plagen.

- B.18 Wat is de mogelijkheid dat het gewas zich verspreidt in Nederland?

Antwoord: Nihil

- B.19 Wat is de mogelijkheid dat het gewas zich verspreidt in de omliggende landen?

Antwoord: Nihil

Uitkruising

- B.20 Beschrijf de bestuivingbiologie van het uitgangsgewas

Antwoord: Lelies zijn zelf-incompatibel; er moet dus kruisbestuiving kunnen optreden om zaad te krijgen. Bestuiving vindt slechts moeizaam plaats via insecten of harde wind en kunstmatig door de mens. Insecten die lelies kunnen bestuiven zijn o.a. bijen, hommels, vliegen, vlinders en nachtvlinders. Welke precies hangt af van liliesoort en geografische locatie, maar de in Nederland geteelde leliehybriden zullen in theorie door de in Nederland voorkomende vertegenwoordigers van bovengenoemde insectenklassen bestoven kunnen worden, op voorwaarde dat er überhaupt sprake is van bloei!

- B.21 Bestaat de mogelijkheid tot kruising van het gewas met cultuursoorten en wilde verwanten in Nederland? Zo ja, beschrijf alle mogelijke kruisingen

Antwoord: Oriental hybride rassen zullen onderling kunnen kruisen (niet met zichzelf!) binnen de sectie Archelirion, niet dus met cultuursoorten afkomstig van andere secties. De sectie Archelirion omvat de soorten *L. auratum*, *L. platyphyllum*, *L. brownii*, *L. japonicum*, *L. nobilissimum*, *L. rubellum* en *L. speciosum* en hun hybriden. Wilde verwanten komen in Nederland niet voor.

- B.22 Bestaat de mogelijkheid tot kruising van het gewas met cultuursoorten en wilde verwanten in omliggende landen? Zo ja, beschrijf alle mogelijke kruisingen

Antwoord: Voor wat cultuursoorten betreft, zie B.21. Wilde soorten van de Archelirion sectie komen niet voor in de ons omliggende landen.

- B.23 Beschrijf of uitkruising daadwerkelijk is waargenomen in Nederland of in omliggende landen. Zo ja, beschrijf de omstandigheden waaronder dit heeft plaatsgevonden

Antwoord: Nee, uitkruising is nooit waargenomen in Nederland of in omliggende landen.

Interacties met andere organismen

- B.24 Beschrijf bekende interacties van het gewas met andere organismen in het ecosysteem waarin het geteeld wordt

Antwoord: Er zijn bij lelie in de teeltgebieden geen symbiotische interacties met andere organismen bekend. Wel wordt de lelie aangevallen door verschillende ziekten en plagen. De plagen omvatten insecten zoals het leliehaantje, *Liriocercis lili*, en verschillende luizensoorten, zoals de groene perzikluise, *Myzus persicae*, en de katoenluise, *Aphis gossypii*, maar ook nematoden, zoals bijvoorbeeld het wortelstelselaaltje *Pratylenchus penetrans*. Deze herbivoren kunnen ook virussen overdragen zoals LSV (Lily Symptomless Virus), LMoV (Lily Mottle Virus) en CMV (Cucumber Mosaic Virus). Pathogene schimmels actief in lelie zijn

bolrot, *Fusarium oxysporum* var. *lilii*, *Cylindrocarpon* spp. en vuur, *Botrytis elliptica* en *B. cinerea*. Deze opsomming van ziekten en plagen is niet volledig, maar bevat de meest belangrijke.

Schadelijke effecten op insecten of planten zijn niet bekend; schadelijke effecten op dieren of mensen bij de teelt zijn ook niet bekend. Wel valt op te merken dat alle leden van het geslacht *Lilium* toxische stoffen bevatten in alle delen van de plant inclusief de bloemen. Deze lycorine-achtige alkaloiden kunnen vooral bij katten ernstig nier-falen veroorzaken als zij van de planten in de tuin of in een vaas eten. In China worden vier soorten geteeld voor consumptie van de bollen in gedroogde vorm als luxe voedsel of voor gezondheidsbevordering. Dit zijn drie vertegenwoordigers uit de sectie Sinomartagon, namelijk *L. davidii*, *L. lancifolium* en *L. pumilum* en één vertegenwoordiger van de sectie Archelirion, *L. brownii*.

Identificatiekenmerken

B.25 Beschrijving van identificatiekenmerken, waarmee de uitgangsplantensoort onderscheiden kan worden van verwanten

Antwoord: Oriental hybriden onderscheiden zich van andere hybriden of *Lilium* soorten door kenmerken als bladbreedte (breder), bolling van de bloemknop (meer dan bij andere lelies of hybriden), zij- of opwaarts gerichte grote bloemen met rondere bloembladeren, kleuren in de range van wit via allerlei tinten roze tot donkerrood; een enkel ras heeft gele strepen. De bloemen geuren sterk en verschijnen relatief laat in het jaar (juni, juli). Bloemstengels zijn stevig en de bloeitijd is zo'n 2 weken langer (12 weken i.p.v. 10).

C. Algemene gegevens over de genetische modificatie

Eerdere of meerdere modificaties

C.1 Is het uitgangsplantenmateriaal reeds genetisch gemodificeerd?
Antwoord: Nee

Algemene gegevens over de genetische modificatie

C.2 Welke wijze van genetische modificatie is toegepast?

Antwoord: De genetische modificatie van de Oriental hybride lelierassen is gedaan met behulp van *Agrobacterium tumefaciens* stam AGL1 plus extra kopie virG gen.

C.3 Wat is het beoogde resultaat van de genetische modificatie?

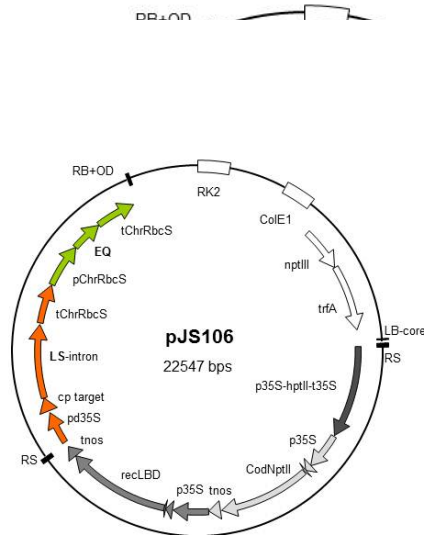
Antwoord: De genetische modificatie is gericht op het introduceren van een tweetal genen die als doel hebben de lelies resistent te maken tegen luizen en daarmee de overdracht van virussen terug te dringen. Chemische bestrijding zou dan gereduceerd kunnen worden en de teelt duurzamer gemaakt.

C.4 Is de genetische modificatie in Nederland uitgevoerd? Zo ja, geef het nummer van de vergunning.
Antwoord: Ja onder vergunning IG 96-004

DNA dat gebruikt is om de plant te modificeren

C.5 Geef een beschrijving van de opbouw van het gehele DNA construct dat gebruikt is in het modificatieproces. Geef hierbij de herkomst en de beoogde functie van alle onderdelen van het construct

Antwoord: Basisvector is de pMF1 zoals beschreven in Schaart et al. 2010. Transformation methods for



De onderdelen met herkomst en functie staan in onderstaande tabel. Geen van de onderdelen coderen voor een schadelijke stof.

Onderdeel	Herkomst	Functie
Vector backbone		
RK2 en ColE1	Brede gastheer plasmiden, o.a. <i>E. coli</i>	Regelen replicatie van het plasmide, vermenigvuldiging, Ori (origin of replication)
nptIII	<i>Streptococcus faecalis</i>	Antibioticum resistentie tegen kanamycine; selectie in de bacterie
trfA	Brede gastheer plasmiden	Bindt aan de Ori en stimuleert replicatie
T-DNA		
LB	Ti plasmide van <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , octopine stam	Bepaalt de overgang tussen T-DNA en plant genomisch DNA of vector DNA. Betrokken bij T-DNA processing in de bacterie en bij de overdracht in de plantencel en bij integratie in het genoom
Rs, recombinatie site	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Bepaalt de specifieke herkenningsplaats van het Recombinase enzyme. Twee Rs in directe oriëntatie op een doorlopend stuk DNA zorgen voor excisie van de tussenliggende DNA sequenties door Recombinase activiteit.
p35S promotor	Cauliflower Mosaic Virus (CaMV)	Constitutieve promotor in planten
hptIII	<i>E. coli</i>	Antibioticum resistentie tegen hygromycine
t35S terminator	CaMV	Terminator sequentie
p35S	CaMV	Zie eerder
IVS intron 5 gbss	<i>Solanum tuberosum</i>	Versterking translatie in plant; remming in

		bacterie. De sequentie is afkomstig van het <i>gbss</i> gen.
AMV 5'UTR	Alfalfa Mosaic Virus	Versterking translatie in plant
CodNptII	<i>E.coli</i>	Fusie tussen 2 genen, <i>coda</i> = cytosine deaminase, functie negatieve selectie tegen aanwezigheid gen op medium met fluorocytosine d.w.z. in geval van geen excisie en <i>nptII</i> positieve selectie voor aanwezigheid gen op medium met kanamycine
tNos	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Terminator sequentie
p35S	Zie eerder	Zie eerder
IVS intron + AMV 5'UTR	Zie eerder	Zie eerder
recLBD	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> + <i>Rattus norvegicus</i>	Fusie tussen het Recombinase gen uit gist en een stukje van een corticosteroid receptor, het ligand bindend domein. Het Recombinase verzorgt de excisie; het LBD zorgt ervoor dat dit pas gebeurt als er met dexamethason is behandeld
tNos	Zie eerder	Zie eerder
Rs	Zie eerder	Zie eerder
pd35S	CaMV	Dubbele promotor
Cp target	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Is een sequentie die ervoor zorgt dat het eiwit naar de chloroplast wordt getransporteerd en geïmporteerd. De sequentie is afkomstig van het small subunit rubisco gen
Linalool synthase + intron	<i>Fragaria x ananassa</i> ; intron van <i>Fragaria vesca</i>	Bepaalt een monoterpenoid biosynthese gen die de precursor geraniol omzet in linalool; het intron voorkomt expressie in <i>E.coli</i> and <i>A.tum</i> .
tChrRbcS	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Bepaalt de terminator sequentie van het small subunit rubisco gen
pChrRbcS	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Bepaalt de promotor sequentie van het small subunit rubisco gen
EQ, equistatin	<i>Actinia equina</i>	Bepaalt een gen dat codeert voor een remmer van cysteine en aspartic proteases effectief vooral in maag/darmsysteem van insecten
tChrRbcS	Zie eerder	Zie eerder
RB+OD	Ti plasmid van <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , octopine stam	Voor RB, zie eerder LB. Naast de border sequentie is een sequentie aanwezig die de overdracht van het T-DNA naar planten moet verbeteren, de z.g. 'overdrive' OD

Alleen de roze gekleurde elementen zijn in de GM lelie planten aanwezig, d.w.z. LB slechts deels.

- C.6 Codeert het construct voor een of meer genproducten die functioneel homolog zijn met van nature in de uitgangsplantensoort voorkomende genproducten?
Antwoord: Nee
- C.7 Bevat het construct sequenties coderend voor toxinen en/of allergenen?
Antwoord: Nee
- C.8 Bevat het construct sequenties waarvan de producten onbekend zijn?
Antwoord: Nee

D. Gegevens over de genetisch gemodificeerde plant (ggp)

[De gegevens waarnaar wordt gevraagd in de onderstaande punten zijn niet voor alle experimenten even relevant, en zijn afhankelijk van de categorie van het veldexperiment. Bijvoorbeeld bij een categorie 1 experiment zijn

gegevens over het aantal kopieën van het insert en de stabiliteit van het insert nog niet essentieel, terwijl dit voor grootschalige experimenten wel het geval zal zijn].

Geschiedenis

- D.1 Zijn er eerder werkzaamheden uitgevoerd met de genetisch gemodificeerde planten of met planten met een vergelijkbare genetische modificatie? Zo ja, geef een beschrijving van de uitgevoerde werkzaamheden en de resultaten hiervan
Antwoord: Niet in het veld, wel in de kas onder IG 96-004.
- D.2 Zijn er kruisingen van de primaire GGP met andere GGP's uitgevoerd?
Zo ja, geef aan of deze kruisingsproducten deel uitmaken van de aangevraagde werkzaamheden
Antwoord: Nee

Eigenschappen

- D.3 Geef een beschrijving van de nieuwe of gewijzigde eigenschappen van het GGP
Antwoord: De nieuw geïntroduceerde eigenschap is resistentie tegen zuigende insecten zoals bladluizen. Hiertoe zijn twee genen ingebracht, één verantwoordelijk voor de productie van een vluchtige stof, linalool, die als deterrent (afschrikker) moet fungeren om het aantal luizen dat besluit op de planten te landen te verminderen en één coderend voor een remmer van de vertering van eiwitten die in het maag/darm systeem van de luizen actief moet zijn en de groei, ontwikkeling en reproductie moet tegengaan in geval de luizen toch geland zijn en zich gevoed hebben met het floëemsap van de lelies.

Insertie

- D.4 Omschrijf welke sequenties zijn ingebracht
Antwoord: De sequenties die zijn ingebracht zijn de roze gekleurde sequenties van tabel 1 (zie boven). Dit betreft de restanten van de linker en rechter T-DNA border, één recombinatie site (Rs), promotor en terminator sequenties t.b.v. de transcriptie van de genen van DNA in RNA, de coderende sequentie van het linalool synthase (LS) gen uit aardbei, uitgerust met een 'targeting' sequentie die ervoor zorgt dat het LS eiwit in de chloroplast actief is, waar de meeste terpenoïden gesynthetiseerd worden. Het LS gen heeft ook een intron afkomstig van de wilde aardbei die voorkomt dat er al in de bacterie expressie plaatsvindt. Tot slot, de sequentie coderend voor een proteïnase inhibitor, equistatine (EQ), afkomstig van een zeeanemoon. De proteïnase inhibitoren (PI) van dieren blijken actiever tegen vertering van eiwitten bij bepaalde primitieve diersoorten dan de PI van planten.
- D.5 Is de insertie geheel of gedeeltelijk aanwezig in het GGP en op welke wijze is dit bepaald?
Antwoord: M.b.v. PCR is de aanwezigheid van zowel LS als EQ aangetoond. M.b.v. RT-PCR is de expressie van het LS gen (omzetting van DNA in mRNA) aangetoond. Dit is een aanwijzing dat promotor, terminator en coderende regio voor LS aanwezig en functioneel zijn. Expressie van EQ is nog niet aangetoond.
- D.6 Hoeveel kopieën van de insertie zijn aanwezig in de plant?
Antwoord: Onbekend
- D.7 Is het insert nucleair of extranucleair gelokaliseerd?
Antwoord: Nucleair.
- D.8 Is de insertie stabiel aanwezig?
Antwoord: Onbekend. De planten zijn in 2009 gemaakt en in 2012 in de kas getoetst. Zolang is de insertie stabiel aanwezig.
- D.9 Is de afwezigheid van de vector in het GGP bepaald? Zo ja, overleg de gehanteerde methode en de resultaten.
Antwoord: Ja, m.b.v. PCR op *hptII*, *nptIII*. De PCRs zijn uitgevoerd met een controle in dezelfde PCR-reactie op een endogeen gen, *Cox*

Expressie

- D.10 In welke weefsels of ontwikkelingsstadia van de plant komen de nieuwe of gewijzigde eigenschappen tot expressie?
 Antwoord: Niet in detail op weefselniveau bekeken, maar de gebruikte 35S promotor zou expressie door de gehele plant moeten geven en in elk stadium. Dit is ook de bedoeling. De rubisco small subunit promotor geeft licht-gereguleerde expressie in de groene plantendelen, d.w.z. met fotosynthese activiteit. De expressie in wortels, bloembladeren of stuifmeel zal laag zijn. Resistentie tegen luizen is getoetst op bladeren en op hele planten. RT-PCR is gedaan op blad.
- D.11 Wat is het niveau van expressie in deze weefsels en gedurende deze ontwikkelingsstadia en met welke methode is dit bepaald?
 Antwoord: Onbekend; er is geen kwantitatieve RT-PCR uitgevoerd. Jong blad van planten uit de kas is biochemisch geanalyseerd op linalool m.b.v. GC en op equistatine via eiwitgelelektroforese. Er kon geen linalool of equistatine aangetoond worden m.b.v. de gebruikte methoden.

Verschillen van het ggp en eventuele uitkruisingsproducten ten opzichte van de uitgangsplantensoort

[Hier wordt gevraagd naar alle verschillen van het GGP, en alle eventuele producten van uitkruising ten opzichte van de uitgangsplantensoort, die in relatie staan met de punten die onder B. (gegevens van de uitgangsplantensoort) zijn genoemd]

- D.12 Voortplantingswijze en/of -duur?
 Antwoord: Er worden op grond van de modificatie geen wijzigingen verwacht. Een en ander kan in de veldproef categorie 1 nader bestudeerd worden.
- D.13 Overlevingsstructuren en/of duur?
 Antwoord: Er worden op grond van de modificatie geen wijzigingen verwacht. Een en ander kan in de veldproef categorie 1 nader bestudeerd worden.
- D.14 Verspreidingswijze en/of duur?
 Antwoord: Er worden op grond van de modificatie geen wijzigingen verwacht. Een en ander kan in de veldproef categorie 1 nader bestudeerd worden.
- D.15 Bestuivingwijze?
 Antwoord: Er worden op grond van de modificatie geen wijzigingen verwacht. Een en ander kan in de veldproef categorie 1 nader bestudeerd worden.
- D.16 Uitkruising?
 Antwoord: Er worden op grond van de modificatie geen wijzigingen verwacht. Een en ander kan in de veldproef categorie 1 nader bestudeerd worden.
- D.17 Biologische inperking?
 Antwoord: Er worden op grond van de modificatie geen wijzigingen verwacht. Een en ander kan in de veldproef categorie 1 nader bestudeerd worden.
- D.18 Competitieve eigenschappen?
 Antwoord: Resistentie tegen insecten en daardoor een mindere infectie door virussen kan minder ziekte en minder uitval betekenen en daarmee dus een competitief voordeel in vergelijking met niet-resistente uitgangscultivars. Resistentie tegen luizen komt ook van nature in de genenpool van *Lilium* hybriden voor. T.o.v. die resistente cultivars zal er geen competitief voordeel zijn. Let wel, de bollen worden in de praktijk gerooid en daarom zal er van een competitief voordeel geen sprake zijn.
- D.19 Toxische/allergene effecten?
 Antwoord: De lycorine-type alkaloiden die van nature in soorten van de *Liliaceae* familie voorkomen zijn toxisch bij ingestie vooral voor katten, veel minder voor de mens. De introductie van het linalool synthase

gen zorgt voor de aanmaak van linalool, een monoterpeneïde stof die in veel planten voorkomt, zoals in de aardbei waaruit het gen is geïsoleerd en die volop wordt geconsumeerd. De stof wordt gebruikt als geuren- en smaakstof, maar ook als insecticide tegen vlooien en kakkerlakken. Toepassing als repellent tegen muggen vindt plaats maar aan de effectiviteit wordt getwijfeld. Repellente werking bij luizen is aangetoond. Veel planten maken proteïnase inhibitoren aan, vooral in opslagorganen zoals knollen of zaden. De bovengrondse delen maken ze als reactie op verwonding en vraat. Proteïnase remmers komen voor in verschillende vormen en in diverse weefsels van dieren, planten en sommige microorganismen. Dit soort remmers zijn actief tegen een breed bereik van insecten (rupsen, kevers, luizen, thrips etc.) en niet tegen zoogdieren en mensen. Insecten kennen diverse typen proteïnases en voor een goede afweer moet de plant verschillende proteïnase remmers tot zijn beschikking hebben. Dit lukt niet altijd en overal. De insecten ontwikkelen ook resistentie tegen de planten PI. Daarom zijn de PI afkomstig van dieren, zoals equistatine, effectiever om planten tegen insecten te beschermen. De PIs worden geclassificeerd aan de hand van de proteïnases die zij remmen. Equistatine is een cysteine, aspartic proteïnase remmer. De remmende werking is gebaseerd op de interactie van domeinen binnen de PI die sterk lijken op het substraat van de proteïnase met de actieve site, substraat-bindende regio van de proteïnase. Deze binding kan slechts zeer moeizaam ongedaan worden gemaakt en daarmee is de proteïnase niet beschikbaar voor het echte werk, het opknippen van eiwitten. Ook is gepostuleerd dat als reactie op de inactivatie er in de alveesklier grootschalig nieuwe proteïnases worden aangemaakt zodat daarmee de voorraad vrije aminozuren voor andere eiwitten/enzymen versneld uitgeput raakt. Die nieuwe proteïnases worden op hun beurt weer geïnactiveerd.

Allergische reacties op linalool of equistatine zijn nooit gevonden. Er is geen bewijs gevonden voor toxische of anderszins negatieve effecten van proteïnase remmers op zoogdieren. Van sommigen is wel een effect gemeld op aaltjes, virussen, schimmels of bacteriën (Hag et al. 2004; Fan & Wu 2005).

D.20 Andere schadelijke effecten?

Antwoord: Er worden op grond van de modificatie geen wijzigingen verwacht. Een en ander kan in de veldproef categorie 1 nader bestudeerd worden.

D.21 Symbiotische eigenschappen?

Antwoord: Er worden op grond van de modificatie geen wijzigingen verwacht. Een en ander kan in de veldproef categorie 1 nader bestudeerd worden.

D.22 Resistenties/toleranties?

Antwoord: Dit is bij uitstek het punt waarop de GGP's zullen verschillen t.o.v. de niet-GGP uitgangscultivars. Het doel van de modificatie was de introductie van resistentie tegen luizen in lelie. Let wel, in andere hybriden in het geslacht *Lilium* komt van nature resistentie voor. De eigenschap op zich is dus niet nieuw in lelie, wel de manier waarop die bereikt is.

D.23 Interacties met doelorganismen?

Antwoord: De interactie met de doelorganismen, bladluizen, is gewijzigd o.i.v. de modificatie. De emissie van linalool als repellent zal ertoe leiden dat de luizen bij voorkeur bij andere planten hun heil zoeken. Mocht de repellente werking afwezig of onvoldoende zijn, bijvoorbeeld door milieumomstandigheden (veel wind), dan zorgt de equistatine ervoor dat de luizen stoppen met groeien, met het bereiken van de volgende ontwikkelingsstadia en met reproduceren. Hiermee wordt de populatieopbouw tegengegaan en de ziektedruk verminderd.

D.24 Interacties met niet-doelorganismen?

Antwoord: De insectenwerende werking zal zich niet beperken tot bladluizen. In andere gewassen ondervinden ook plaaginsecten zoals kevers, rupsen en thripsen hinder in hun groei en ontwikkeling. In een metastudie naar de effecten van Bt en PIs op predatoren van plaaginsecten of parasitaire organismen bleken zowel positieve, neutrale maar toch ook negatieve effecten van PIs aangetroffen te worden (Lövei et al. 2012). Bij lelie valt de denken aan een negatief effect op het leliehaantje als ander plaaginsect. In het veld zullen er uitwijkmogelijkheden voldoende zijn voor zowel de plaaginsecten zelf als hun predatoren of parasieten. De lilies zullen in het veld niet bloeien dus bestuivers zoals bijen en vliegen zullen zich niet kunnen voeden met het leliestuifmeel. In andere GM gewassen met het PI gen onder controle van de 35S promotor kon geen PI eiwit in het stuifmeel aangetoond worden.

D.25 Interacties met het abiotische milieu?

Antwoord: Er worden op grond van de modificatie geen wijzigingen verwacht. Een en ander kan in de veldproef categorie 1 nader bestudeerd worden.

- D.26 Zijn er verschillen van het GGP ten opzichte van de uitgangsplantensoort anders dan hierboven genoemd?
Antwoord: Er worden op grond van de modificatie geen verdere wijzigingen nog verwacht. Een en ander kan in de veldproef categorie 1 nader bestudeerd worden.
- D.27 Beschrijving van de technieken waarmee het GGP van de uitgangsplantensoort kan worden onderscheiden
Antwoord: De GGP lelies kunnen geïdentificeerd worden en onderscheiden van de uitgangscultivar d.m.v. PCR. Hiervoor kan een uniek primer-paar ontwikkeld worden per individuele GM lelie met één primer in het T-DNA en één in het lelie DNA.

E. Gegevens over de voorgenomen introductie in het milieu

Locatie

- E.1 Hoeveel mogelijke locaties worden voor de introductie aangevraagd?
Antwoord: Één (1). Het proefobject zal in opvolgende jaren op andere plekken binnen dezelfde locatie worden ingericht i.v.m. voorkoming ziektedruk door aaltjes.
- E.2.a. In welke gemeenten liggen deze locaties?
Antwoord: Wageningen
- E.2.b. Wordt er een isolatieafstand gehanteerd? Zo ja hoe groot is deze?
Antwoord: Nee

De onderstaande vragen zijn afhankelijk van de categorie veldproef en of er een isolatieafstand wordt gehanteerd. Voor de beantwoording van de vragen, wordt u aangeraden eerst de bijgevoegde toelichting (Bijlage 3) te lezen.

CATEGORIE 1 VELDPROEF MET ISOLATIEAFSTAND

- E.3.a. Beantwoord deze vragen per aangevraagde locatie voor een categorie 1 veldproef waarvoor een isolatieafstand wordt gehanteerd.
1. Is de attenderingszone (zie toelichting) geheel gelegen in het gebied waarover u zeggenschap heeft?
Zo nee, ga naar vraag E.3.a.2.
Zo ja, ga naar vraag E.3.a.3.
 2. Kan er akkerbouw* plaatsvinden binnen de attenderingszone waarover u geen zeggenschap heeft?
Toelichting: Indien dit het geval is wordt u aangeraden om voorafgaand aan elk teeltseizoen na te gaan of ook binnen de isolatiezone akkerbouw kan plaatsvinden waarover u geen zeggenschap heeft. Indien dat het geval is, wordt u aangeraden schriftelijke afspraken te maken met degene(n) die zeggenschap heeft/hebben over die akkerbouw, inhoudende dat hij het betreffende cultuurgewas niet in de isolatiezone zal verbouwen. Voor zover u geen schriftelijke afspraken maakt, zult u gedurende het teeltseizoen tweewekelijks moeten controleren of de isolatiezone daadwerkelijk in acht wordt genomen.*
* In het geval van een aanvraag met genetisch gemodificeerde bomen waarvoor een isolatieafstand wordt gehanteerd, wordt hier geduid op de teelt van bomen in de isolatiezone
 3. Locatiekaarten
Lever van iedere locatie een kopieerbare topgrafische (Topografische Dienst, schaal 1:25.000 of gedetailleerder) en een kadastrale kaart aan. De kaarten moeten in kleur zijn. Deze kaarten moeten ook elektronisch aangeleverd worden, als pdf file. Op deze kaarten moeten de volgende zaken herkenbaar zijn ingetekend:
 - Het kadastrale perceel of gedeelte hiervan (waarbinnen het proefobject is gelegen).
 - De attenderingszone;
 - De grenzen van het gebied waarover u zeggenschap heeft;
 - De mogelijkheid van akkerbouw binnen de attenderingszone waarover u geen zeggenschap heeft (indien van toepassing).

CATEGORIE 1 VELDPROEF ZONDER ISOLATIEAFSTAND

E.3.b. Locatiekaarten

Nergena, op zandgrond.

Lever van iedere locatie een kopieerbare topografische (Topografische Dienst, schaal 1:25.000 of gedetailleerder) en een kadastrale kaart aan. De kaarten moeten in kleur zijn. Deze kaarten moeten ook elektronisch aangeleverd worden, als pdf file. Op deze kaarten moeten het kadastrale perceel of gedeelte hiervan (waarbinnen het proefobject is gelegen) herkenbaar zijn ingetekend.

CATEGORIE 2 OF 3 VELDPROEF

E.3.c Locatiekaarten

Lever van iedere locatie een kopieerbare topografische kaart aan (Topografische Dienst, schaal 1:25.000 of gedetailleerder). De kaarten moeten in kleur zijn. Deze kaarten moeten ook elektronisch aangeleverd worden, als pdf file. Lever een kaartuitsnede aan waarin het gebied waar de veldproef plaatsvindt als een rechthoek is ingetekend. De rechthoek mag maximaal 100 keer zo groot zijn als de aangevraagde locatie (dus als 1 ha aangevraagd, gebied van maximaal 100 ha ingetekend op een grotere kaart).

E.4 Hoeveel locaties worden jaarlijks daadwerkelijk gebruikt voor de introductie?

Antwoord:

E.5 Zijn de onder E.1 genoemde locaties eerder gebruikt voor introductie in het milieu van GGP's?

Antwoord:

Zo ja, voor welke GGP's?

Antwoord:

Zijn er nog monitoringsverplichtingen verbonden aan deze locaties?

Antwoord:

Zo ja, geef aan onder welk vergunningnummer

Antwoord:

E.6 Oppervlakte per locatie

Antwoord:

E.7 Gezamenlijk oppervlak van alle locaties die jaarlijks worden gebruikt

Antwoord:

Ecosysteem

E.8 Verschilt het type ecosysteem van het introductiegebied van dat waarin de uitgangsplantensoort gewoonlijk wordt geteeld?

Antwoord: Nee, de teelt van lelies vindt voor de helft plaats op zand, vnl. Bollenstreek, Kennemerland en Noordelijk Zandgebied en voor de helft op klei, vnl. West-Friesland en Flevoland in de volle grond, akkers. In Wageningen betreft het zandgrond. In de regio worden niet op commerciële schaal bollen geteeld, maar een deel van het materiaal afkomstig van het reguliere veredelingsprogramma van Wageningen UR Plant Breeding wordt op qua ecosysteem vergelijkbare percelen in de buurt aangehouden en opgekweekt.

Zo ja, in welke zin?

Antwoord:

E.9 Wat is de afstand tot officieel erkende biotopen en officieel beschermde gebieden die kunnen worden beïnvloed door de GGP's door uitkruising met wilde verwanten of door verwildering?

Antwoord: Er zijn geen officieel erkende biotopen of beschermde gebieden specifiek voor de lelies. Er komen geen kruisbare, wilde verwanten voor in Nederland en Europa. Zoals eerder aangegeven bij onderdeel **B** komt uitkruising niet voor, ook niet met verwante Oriental hybriden, net zo min als verwildering. Dichtstbijzijnde beschermde gebied is het Natura 2000 gebied "Uiterwaarden Neder-Rijn" wat gelijk is aan het Vogelrichtlijngebied "Uiterwaarden Neder-Rijn". Dit ligt op zo'n 3 kilometer afstand in vogelvucht.

Opzet van experiment en introductie

- E.10 Beschrijf de opzet van het experiment
 Antwoord: Van elke lijn, d.w.z. te bemonsteren GGP en de non-GM controles, worden 4 herhalingen in twee blokken (bedden) geplant. Elk bed bevat een aantal rijen die onderling op 30 cm afstand van elkaar liggen en waarbinnen de individuele bollen onderling op 10 cm geplant worden. Een rij is maximaal 1 meter lang. Tussen de twee bedden wordt een afstand van minimaal 1 meter aangehouden alsmede tussen de bedden en de randen van het proefobject. Elk bed wordt rondom begrensd door een randrij, d.w.z. daar worden non-GM bollen van een willekeurige Oriental hybride geplant. Het totale proefobject zal bij aanvang ongeveer 30 m² groot zijn. De landbouwkundige handelingen zijn planten, afgazen, onkruidbestrijding, ziekte (Botrytis) bestrijding, koppen en rooien.
[Geef hierbij in grote lijnen aan hoe het proefobject wordt ingedeeld, inclusief het aantal herhalingen, evt. randrijen, en landbouwkundige handelingen die worden uitgevoerd]
- E.11 Beschrijf de behandeling van het gebied vóór de introductie
 Antwoord: Voor introductie wordt het perceel geploegd, geëgaliseerd, bemest en de bedden geprepareerd volgens plantschema.
- E.12 Hoeveel GGP's worden geïntroduceerd (per locatie en totaal jaarlijks)?
 Antwoord: 128. Gedurende de looptijd van de vergunning kunnen er nummers afvallen en nieuwe nummers, d.w.z. 'events' van dezelfde genetische modificatie met dezelfde Oriental hybride cultivars, toegevoegd worden. Mogelijk wordt ook het aantal herhalingen in de loop van de veldproef verhoogd.
- E.13 Welke methode(n) wordt gebruikt voor de introductie?
 Antwoord: De bollen zullen op het proefobject worden geplant volgens de in E.10 beschreven systematiek.
- E.14 Beschrijf de methoden om betreding van het gebied door onbevoegden te voorkomen
 Antwoord: Het perceel van Wageningen UR Unifarm is omheind en afgesloten met een hek met slot. Bordjes met 'Verboden Toegang' zijn opgehangen.
- E.15 Beschrijf de methoden om de toegang van andere organismen tot het gebied te voorkomen
 Antwoord: Het deel van het perceel waar de bollen worden geplant is nog eens apart omgeven met gaas om vraat door reeën, hazen of konijnen tegen te gaan.
- E.16 Indien onder A.6 is aangegeven dat de GGP's gebruikt worden in consumptie-experimenten, geef aan wat de opzet en de aard van de experimenten is.
 Antwoord: n.v.t.

Vervoer

- E.17 Beschrijf de wijze van vervoer en verpakking van de GGP's en delen van GGP's
 Antwoord: De bollen zullen in afgesloten netten in afgesloten plastic zakken voorzien van gaten voor doorluchting in kratten worden vervoerd in een gesloten bestelbus. Het materiaal is voorzien van labels waarop de soort, cultivar, feit dat het GGP's zijn, vergunningnummer en naam verantwoordelijk onderzoeker zijn aangegeven.

Na afloop van het experiment

- E.18 Beschrijf de behandeling van het introductiegebied na afloop van het experiment, zoals opslagbestrijding. Geef bij iedere behandeling aan op welke wijze dit plaatsvindt.
 Antwoord: In elk opvolgend jaar zal het proefobject gemonitord worden voor opslag en overblijvers zullen met een bestrijdingsmiddel worden 'bestreken'.

- E.19 Beschrijf de behandeling van de GGP's, delen van GGP's, en materiaal dat daarvan is afgeleid, na afloop van het experiment
 Antwoord: De gerooide bollen zullen worden gespoeld en geplozen, d.w.z. gevormde bijbollen zullen worden verwijderd. Die kunnen als extra herhalingen het jaar daarna worden geplant indien nodig. Vervolgens worden de bollen ontsmet en in zakken gedaan met wat potgrond (gelaagd) en opgeslagen bij +1 °C in de koelcel.
- E.20 Beschrijf de soort en hoeveelheid geproduceerd afval
 Antwoord: Na het koppen zijn daar de bloemknoppen als afval, na het groeiseizoen voor de oogst van de bollen zal het loof (stengels en bladeren) vanzelf vergaan zijn. De bloemknoppen kunnen afgevoerd worden of op het veld gedeponeerd om te vergaan.
- E.21 Geef een beschrijving van de afvalverwerking
 Antwoord: Het afval vergaat op het veld.

F. Analyse van de te verwachten effecten van de ggp op mens en milieu

Dit is de centrale vraag van de aanvraag!!

[Geef naar aanleiding van de voorgaande vragen een uitgebreide analyse van de te verwachten effecten van de GGP op mens en milieu, waarbij Bijlage II van de Richtlijn 2001/18/EC en het hierbij behorend richtsnoer(2002/623/EG) van de Europese Commissie wordt gevolgd. Bij de analyse dienen zowel directe, indirecte, onmiddellijke en vertraagde effecten van de GGP op mens en milieu in beschouwing te worden genomen.

De risicoanalyse moet worden uitgevoerd voor ieder GGP waarop deze aanvraag betrekking heeft individueel, en indien relevant ook voor combinaties van de GGPs.

In de risicoanalyse moeten de effecten van de GGP's in beschouwing worden genomen die voortvloeien uit interacties van de ggo's onderling en in het/de milieu(s) waarin zij door de in de aanvraag beschreven introductie terecht (kunnen) komen; het gaat hierbij om effecten die betrekking hebben op de veiligheid van mens en milieu. In bijlage I van dit formulier staan aspecten beschreven die in ieder geval in beschouwing genomen moeten worden.

Een risicoanalyse omvat de volgende onderdelen, die in de aangegeven volgorde volledig moeten worden behandeld:

- 1. inventarisatie van de mogelijke negatieve effecten die kunnen optreden;*
- 2. een schatting van de kans of de mogelijkheid dat deze effecten daadwerkelijk optreden;*
- 3. op basis van 1 en 2: een evaluatie van de risico's, en een inschatting van de ernst van die risico's. Bij de inschatting van de ernst kan een vergelijking worden gemaakt met de ernst die wordt toegekend aan vergelijkbare risico's, bijvoorbeeld in vergelijkbare situaties waarbij effecten optreden met niet-GGP's ('baseline principe').*
- 4. indien in 3 de conclusie wordt getrokken dat het risico te hoog is, moet worden nagegaan welke risicobeheersingmaatregelen (zoals het verwijderen van bloeiwijzen of hanteren van isolatieafstanden) kunnen worden toegepast om de risico's doelmatig terug te dringen;*
- 5. eindconclusie van de risicoanalyse waarin wordt aangegeven welke risicobeheersingmaatregelen zullen worden toegepast, en een conclusie wordt getrokken over de aanvaardbaarheid van de risico's, bij toepassing van de beschreven risicobeheersingmaatregelen.*

Beantwoord nu de onderstaande vragen:]

- F.1 Geef aan welke mogelijke nadelige effecten (directe, indirecte, onmiddellijke en vertraagde effecten) gepaard kunnen gaan met blootstelling van mens of milieu aan het GGP
 Antwoord: Mogelijk nadelige effecten zouden moeten komen van de geproduceerde genproducten, linalool en de proteinase inhibitor. Linalool is een bekende geur- en smaakstof die in vele planten voorkomt en in veel producten zoals zepen en shampoos wordt toegepast. Linalool kan irritatie van huid en ogen veroorzaken en de geoxideerde vorm van linalool kan een allergische reactie geven in de vorm van eczeem. Als maatregelen daartegen wordt aangeraden om inademen van linalool en contact met de ogen

te vermijden en de ogen te spoelen met water. Linalool kan echter ook een therapeutische werking hebben tegen vormen van kanker.

Proteinase inhibitoren komen in veel planten en dieren voor en dienen als afweer tegen microorganismen (bacteriën en schimmels) en tegen insecten. Remming van proteolyse verhindert de vertering van voedsel en dan vooral de afbraak van eiwitten en daarmee het beschikbaar komen van bouwstenen zoals aminozuren. Zie ook D.19 en D.24

- F.2 Geef aan in hoeverre de in F.1 beschreven nadelige effecten ook daadwerkelijk kunnen optreden
 Antwoord: De nadelige effecten van linalool treden alleen op met gezuiverd en geconcentreerd linalool of linalool verkregen door biochemische synthese, dus in zijn pure vorm. De allergische reactie vindt plaats o.i.v. een oxidatieproduct van linalool en aangezien linalool stabiel is komt dat product niet veel voor en dan nog alleen bij de gezuiverde preparaten of in de afgeleide persoonlijke verzorgingsproducten. Linalool in planten komt niet voor in hoeveelheden of vormen die de genoemde effecten kunnen geven. Linalool kan in planten ook in geconjugeerde (= gebonden) vorm voorkomen en is dan niet vluchtig. Vrijkomen kan dan bij verwonding bijvoorbeeld. In planten is de hoeveelheid te laag; in de hier behandelde GGPs, de lelies, is m.b.v. biochemische technieken geen linalool in zijn vluchtige vorm aangetoond. De geproduceerde linalool is mogelijk gebonden en zal pas bij verwonding door vraat vrijkomen en dan in minieme hoeveelheden. In het veld zal de geproduceerde hoeveelheid linalool al snel verdund worden bij vervluchtiging in de lucht. Het is dan ook uiterst onwaarschijnlijk dat de voor pure linalool beschreven effecten kunnen optreden bij teelt of oogsten of andere handelingen met de GGP-lijes.
 De gebruikte proteinase inhibitor, equistatine, is niet werkzaam bij zoogdieren (1). Veel planten bevatten PI's en kunnen zonder gevolgen gegeten worden door de mens en andere zoogdieren. Er zijn vele vormen van proteinases en ook diverse typen proteinase inhibitoren. Insecten hebben ook resistenties of toleranties tegen in planten voorkomende PI's ontwikkeld. 100% Effectiviteit van een PI tegen alle proteinases in elk organisme bestaat dan ook niet. De GGPs van deze aanvraag, lijes, worden niet door mens of dier voor consumptie gebruikt (2). De aanwezigheid in de lijes van equistatine kon tot nu toe niet aangetoond worden; de aanwezige niveaus zijn te laag (3). Op basis van de drie hiervoor genoemde factoren bestaat er geen risico op beïnvloeding van de vertering van voedsel bij mens en dier. Met als uitzondering natuurlijk bij luizen en mogelijk andere insecten. De beïnvloeding daar uit zich niet in onmiddellijke toxiciteit maar in een verminderde vruchtbaarheid en reproductie zodat de populatieopbouw wordt verstoord. Voor de insecten zijn er voldoende uitwijkmogelijkheden.
- F.3 Geef een schatting van het risico van elk van de nadelige effecten waarbij de effecten van eventuele risicobeheersingmaatregelen zijn meegenomen.
 Antwoord: De risico's van elk van de mogelijk schadelijk effecten zijn uiterst gering. De schadelijke effecten zelf zijn gering van aard en de kans dat zij optreden is miniem. De lijebollen in deze aanvraag zijn niet bestemd voor extractie, opzuivering en concentratie van secundaire metabolieten en niet voor consumptie.
- F.4 Indien onder F.3 een maatregel is voorgesteld ter beheersing van de risico's, geef dan een omschrijving van deze maatregel.
 Geen extractie, opzuivering en concentratie van secundaire metabolieten en geen consumptie.
- F.5 Geef aan welke locatiespecifieke aspecten in beschouwing zijn genomen in de risicoanalyse. Indien er geen locatiespecifieke aspecten zijn, voer dan de risicoanalyse uit voor heel Nederland.
 Antwoord: Geen locatiespecifieke aspecten.
 Voor heel Nederland:
 1) Het is niet waarschijnlijk dat de lelie GGPs persistenter of invasiever geworden zijn door de introductie van resistentie tegen luizen. Persistentie en invasiviteit hebben vooral te maken met verhoogde verspreidingsmogelijkheden of betere overleving. Bolvorming of bolgroei zal niet door de modificatie veranderd zijn. Voor vestiging en groei zijn dezelfde eigenschappen van de grond qua waterdoorlaatbaarheid van kracht en ook de overleving van koude winters zal niet gewijzigd zijn. Hetzelfde geldt voor bloei en zaadzetting, nog los van het feit dat in deze veldproef de bloemen gekopt zullen worden voordat de bloemen openen.
 2) De GGPs kunnen een selectief voordeel hebben van de geïntroduceerde insectenresistentie t.o.v. de vatbare uitgangscultivars. Dit voordeel bestaat niet t.o.v. lijes cultivars die van nature al resistent zijn tegen insecten. In deze veldproef zal geen sprake zijn van voordeel, maar later bij de teelt ook niet.
 3) De kans op geverdracht op verwante Oriental hybriden is uiterst gering, niet alleen in de veldproef maar ook later bij teelt. De bloemen worden gekopt. Broei tot bloei vindt in aparte kassen (dus ingeperkt) plaats en dan worden de bloemen geoogst voordat zij geopend zijn. Kruising en zaadvorming in de vaas bij de consumenten thuis vindt niet plaats. Uitkruising vindt onder de huidige teeltomstandigheden ook niet

plaats. Deze situatie zal in geval van teelt van deze GGP's niet veranderen.

4) De modificatie is erop gericht om de interactie tussen de GGP's en de doelwitorganismen te wijzigen. De doelwitorganismen zijn diverse luizensoorten, die virussen overbrengen. De vorming van linalool moet ervoor zorgen dat zij er minder voor zullen kiezen om op de lelies te landen; zij zullen zich richten op andere planten. De equistatine zorgt ervoor dat als de luizen onvoldoende worden afgeschrokken door de linalool, zij na opname van floeemsap met de proteïnase inhibitor het voedsel onvoldoende zullen kunnen verteren waardoor zij achterblijven in groei, niet het volgende ontwikkelingsstadium zullen bereiken en verminderd vruchtbaar zullen zijn. Hierdoor zal de populatieopbouw in het leliegewas verminderen en dit zal uiteindelijk tot minder ziekteopbouw en virusinfecties leiden.

5) Andere vretende of zuigende insecten of aaltjes of microorganismen zijn niet direct de primaire doelwitten, maar als zij schade aan het gewas geven zoals bijvoorbeeld vraat door leliehaantjes (kevertje), dan is het verwachte afwerende effect van de modificatie ook gewenst te noemen. Over het algemeen zullen er voldoende uitwijkmogelijkheden zijn. Bestuivende insecten zoals bijen en vliegen zullen er geen negatieve effecten van ondervinden omdat de GGP's niet zullen bloeien en er geen stuifmeel vrijkomt. Daarenboven blijkt uit experimenten waarin gezuiverd PI eiwit werd toegevoegd aan niet-GM koolzaad pollen en gevoerd aan bijen en hommels er geen negatief effect op mortaliteit of leervermogen optrad (Pierre and Pham-Delegue, 2000). Opgemerkt dient nog te worden dat vertegenwoordigers van het geslacht *Lilium* van zich zelf al in bepaalde mate toxisch zijn door de aanwezigheid van lycorine-alkaloiden. Ook hier zal de modificatie niets aan wijzigen.

6) Het eten van lelie plantendelen, ook niet GGP's dient te worden vermeden. De hoeveelheden gevormd linalool zijn te gering om enig negatief effect op de menselijke gezondheid te hebben zoals irritatie van huid, ogen of luchtwegen. Linalool wordt ook toegepast als smaakstof in voedsel en als geurstof in zepen en shampoos en kan een gunstig effect hebben op sommige vormen van kanker. De proteïnase inhibitoren zijn niet werkzaam in zoogdieren en alom aanwezig in diverse plantensoorten. Als zij al enig effect zouden hebben dan kan dat pas na ingestie, dus na eten van delen van de lelies. Dit laatste is niet aan de orde. Oriental hybride lelies worden niet gegeten.

7) Voor de mogelijke effecten op de gezondheid van dieren geldt hetzelfde als voor de mens (zie 6). Er worden totaal geen effecten verwacht; lelies worden niet gebruikt voor veevoer, ook al vanwege hun inherente toxiciteit, vooral voor katten. Het materiaal van deze veldproef wordt ook niet gebruikt als veevoer.

8) Linalool komt van nature in diverse plantensoorten voor. Het hier gebruikte gen is afkomstig van aardbei. Lavendel is een andere bekende bron die op grote oppervlakten geteeld wordt net als aardbei. T.o.v. deze non-GGP referenties worden er geen andere of heviger effecten verwacht van lelies met linalool. De gehalten in lelies zijn ook lager. Pls zoals equistatine worden in de bodem gewoon afgebroken; zij komen veel voor in planten en bij vergaan van planten op of in de bodem verdwijnen zij net als alle eiwitten. Er is geen reden enig effect op biogeochemische processen te verwachten.

9) De teelt-, beheers- en oogsttechnieken voor GGP lelies zijn niet anders dan voor non-GGP lelies met uitzondering van het minder hoeven gebruiken van insecticiden om luizen te bestrijden.

F.6 Geef een inschatting van het algehele risico van het GGP voor mens en milieu voor de aangevraagde werkzaamheden.

Antwoord: Het algehele risico van de GGP lelies voor mens en milieu wordt ingeschat als zijnde uiterst gering.

G. Voorgestelde maatregelen voor inperking en risico management

G.1 Welke maatregelen worden genomen om verspreiding van de GGP's te voorkomen?

Antwoord: De bloemen worden gekopt en daarmee wordt verspreiding via stuifmeel voorkomen. De oogst van de bollen in het najaar zal op een voor de teelt gebruikelijke wijze gebeuren met als doel alle bollen te verzamelen.

G.2 Beschrijf alle andere maatregelen die worden genomen om eventuele effecten van de GGP's op mens en milieu te voorkomen.

Antwoord: a) geen effecten verwacht; b) niet vrij-toegankelijke locatie; c) omheind perceel; d) bordjes met "Verboden Toegang".

[Een maatregel die genomen kan worden, is bijvoorbeeld het verwijderen van bloeiwijzen om mogelijke uitkruising van het GGP te voorkomen. Andere voorbeelden van te treffen maatregelen staan genoemd in artikel 6 van druk bij het staan het publicatieblad 2003/701/EG over rapportage van veldproeven].

H. Voorgestelde methoden van observatie tijdens en na afloop van het experiment

H.1 Stel een monitoringsplan op waarin staat aangegeven hoe mogelijke effecten op mens en milieu van de GGP's op de gezondheid van de mens of het milieu worden gesignaleerd tijdens en na afloop van het experiment. Beschrijf hierbij ook welke methoden worden gebruikt om de observaties uit te voeren.

Algemeen:

Na het planten van de bollen in het veld zal er gekeken worden naar de volgende kenmerken:

- a) Opkomst van de bollen.
- b) Bladvorming, rozet en/of aan steel.
- c) Bladvorm en bladstand
- d) Steelvorming, inclusief aantal
- e) Groeisnelheid, groeikracht
- f) Groeistoornissen
- g) Aanleg bloemknoppen, tijd (moment) en aantal
- h) Plantontwikkeling na koppen
- i) Bolmaat en bolgroei, te beoordelen na het oogsten en spoelen
- j) Aanleg secundaire bolletjes, vermeerdering, pluizen
- k) Voorkomen/vatbaarheid voor schimmelziekten als *Fusarium* en *Botrytis*

Specifiek:

- a) Voorkomen/vatbaarheid van/voor luizen
- b) Als afgeleide daarvan het voorkomen van symptomen van virusinfecties
- c) Voorkomen van vraat door andere insecten
- d) Het alert zijn bij elk stadium waarbij handelingen door mensen worden verricht, ook na-oogst, op irritaties van huid, ogen of luchtwegen of op eczeem.
- e) Biochemisch bepalen van linalool (GC-MS) en equistatine (gelelectroforese) gehaltes aan materiaal afkomstig van het veld.
- f) Verkrijgen van antwoorden op vragen van belang bij een categorie 2 aanvraag. Graag vernemen wij tijdig van het Ministerie welke vragen dat zijn, zodat we die in het monitoringsplan kunnen opnemen. Vraag is of die vragen samenhangen met de punten D12 t/m D27, F1 of Bijlage 1 van deze aanvraag of met andere punten??

[Hier moet een omschrijving gegeven worden van alle aspecten die worden geobserveerd tijdens en na afloop van de veldproef, en de methoden die daarbij gebruikt worden. Deze omschrijving moet plaatsvinden in de vorm van een monitoringsplan. Het monitoringsplan moet uit twee delen bestaan: een algemeen en een specifiek gedeelte. Het algemene deel moet ingaan op algemene aspecten van de genetisch gemodificeerde planten, zoals afwijkingen in plantgroei. Het specifieke gedeelte is gerelateerd aan de aard van de genetische modificatie, zoals bij Bt-planten de observatie van effecten op niet-doel insecten.

In het monitoringsplan moet in ieder geval op elk van de onder F.1 geïdentificeerde nadelige effecten van het GGP ingegaan worden, in combinatie met de onder G.1 voorgestelde maatregelen voor risico-management. Indien geen observatie noodzakelijk geacht wordt, dient dit ook expliciet te worden onderbouwd met argumenten.

In het monitoringsplan moet een beschrijving gegeven worden waarin aspecten zoals oppervlakte van het observatiegebied, duur- van de observatie en frequentie van observatie in beschouwing wordt genomen].