



COMMISSIE
COGEM

GENETISCHE
MODIFICATIE

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
dhr J.J. Atsma
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 14 december 2010
KENMERK CGM/101214-01
ONDERWERP Advies "Veldproef met genetisch gemodificeerde appelbomen"

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een adviesvraag over de vergunningaanvraag voor een categorie 1 veldproef getiteld 'schurft-resistente cisgene appels' (IM 10-005) van Plant Research International B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de milieurisico's van een veldproef met genetisch gemodificeerde (gg-) appelbomen (*Malus pumila*) geënt op niet genetisch gemodificeerde onderstammen. De gg-appelbomen brengen het *HcrVf2* gen tot expressie dat schurftresistentie bewerkstelligt. Dit gen is afkomstig van een kruisbare verwante sierappelsoort (*Malus floribunda*).

De COGEM merkt op dat met de voorgenomen inperkingsmaatregelen uitkruising en verspreiding van het ingebrachte gen niet voorkomen zal worden. Het *HcrVf2* gen is echter al in kruisbare verwanten van de gecultiveerde appel, in verschillende via traditionele veredeling verkregen appellassen en in de wilde populatie aanwezig. De bij de transformatie gebruikte vector bevat o.a. de antibioticumresistentiegenen *nptII* en *nptIII*. Op basis van de aangeleverde gegevens kan niet worden uitgesloten dat het *nptIII* gen in de gg-appelbomen is ingebracht. De COGEM heeft eerder geconcludeerd dat bij veldproeven de aanwezigheid van het *nptIII* antibioticumresistentiegen geen milieurisico zal veroorzaken.

De COGEM concludeert dat deze veldproefaanvraag voldoet aan de eisen voor een categorie 2 veldproef. De COGEM heeft tegen de in de aanvraag beschreven werkzaamheden geen bezwaar en acht de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Wel merkt de COGEM op dat de door de aanvrager overlegde gegevens over de afwezigheid van het *nptIII* gen in de gg-appelbomen de wetenschappelijke toets der kritiek niet kunnen doorstaan. Hoewel de eventuele aanwezigheid van dit gen geen milieurisico zal veroorzaken en daarom geen deel uitmaakt van de overweging van de COGEM over deze veldproef, is de COGEM van mening dat mede gezien de maatschappelijke gevoeligheid omtrent de aanwezigheid van antibioticumresistentiegenen het wenselijk is om aanvullende gegevens te laten overleggen.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs
Dr. I. van der Leij

Met het oog op eventuele belangenverstrengelingen zijn de COGEM leden Prof. dr. ir. G.C. Angenent en Dr. ir. H.J. Schouten niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Veldproef met genetisch gemodificeerde schurftresistente appelbomen

COGEM advies CGM/101214-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de milieurisico's van een veldproef met genetisch gemodificeerde (gg-) appelbomen (*Malus pumila*¹). De COGEM is in een vroegtijdig stadium, namelijk voor het opstellen van de ontwerpbeschikking, om advies gevraagd omdat de appelbomen bij deze veldproef in bloei zullen komen. De appelbomen zijn genetisch gemodificeerd met het *HcrVf2* gen dat schurftresistentie bewerkstelligt. Dit gen is afkomstig van een wilde verwant van de appel: de sierappelsoort *Malus floribunda*. De vergunningaanvrager, Plant Research International B.V. wil de schurftresistentie van de gg-appelbomen beoordelen en heeft een vergunning aangevraagd voor een kleinschalige (categorie 1) veldproef. Het betreft hierbij werkzaamheden op één locatie in de gemeente Wageningen. De gg-appelbomen zijn geënt op niet-genetisch gemodificeerde onderstammen.

Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft eerder verschillende keren geadviseerd over gg-appelbomen (*M. pumila*).^{1,2,3,4,5} Deze appelbomen waren schimmelresistent door modificatie met het *hth* gen dat codeert voor α -hordothionine. In het merendeel van deze vergunningaanvragen kwamen de appelbomen niet tot bloei.^{1,3,4,5}

Milieurisicoanalyse

Bij de risicobeoordeling van de introductie in het milieu van genetisch gemodificeerde organismen (ggo's), zoals die door de COGEM wordt uitgevoerd, worden de effecten die het ggo kan hebben op mens en milieu beoordeeld, waarbij de mens als integraal onderdeel van het milieu wordt beschouwd.

Onder risico wordt verstaan de gevolgen van een gevaar in combinatie met de kans dat deze gevolgen zich voordoen. De mogelijke schadelijke effecten van (toepassing van) een ggo worden daarbij vergeleken met die van het ongemodificeerde organisme, de zogenaamde "baseline", waaruit het ggo is afgeleid. Bij de introductie in het milieu wordt door de COGEM de staande landbouw en de klassieke veredeling als "baseline" voor genetische gemodificeerde gewassen gebruikt.⁶

De uitgangspunten en de methodiek van de milieurisicobeoordeling zijn in de EU richtlijn 2001/18/EG en de bijbehorende bijlagen beschreven. Hierin is vastgelegd dat bij de milieurisicobeoordeling zowel gekeken wordt naar mogelijke directe als naar indirecte schadelijke effecten van het ggo. Om tot een risico-inschatting te komen, worden de volgende stappen doorlopen: de identificatie van kenmerken die schadelijke effecten kunnen hebben; de evaluatie van eventuele gevolgen van het mogelijk optreden van schadelijke effecten; de

¹In de loop der tijd zijn er veel verschillende wetenschappelijke namen geweest voor de gecultiveerde appel, zoals *Malus pumila*, *M. communis*, *M. sylvestris* en *M. domestica*. Recente bronnen beargumenteren dat *Malus pumila* de correcte wetenschappelijke naam is voor de gecultiveerde appel.^{8,10} Anderzijds valt op te merken dat de gecultiveerde appel en *M. sieversii* tot dezelfde soort behoren.¹⁰

evaluatie van de kans op het optreden van mogelijke schadelijke effecten; een schatting van het risico dat aan elk bepaald kenmerk van het ggo is verbonden; de bepaling van risicomanagementmaatregelen; en de bepaling van het algehele risico van het ggo.

Bij de huidige aanvraag kijkt de COGEM naar de risico's voor mens en milieu die verbonden zijn aan de introductie in het milieu van gg-appelbomen met een verhoogde resistentie tegen Appelschurft (*Venturia inaequalis*) die zijn geënt op niet-genetisch gemodificeerde onderstammen. Zowel directe als indirecte effecten worden beoordeeld. Hierbij zijn de kans op verspreiding door bijvoorbeeld pollen of zaden, het eventueel uitkruisen van appel met wilde verwanten of andere verwanten, mogelijke veranderingen in persistentie en invasiviteit van de plant en verwildering van belang. Daarnaast wordt gekeken naar eventuele nadelige effecten indien de ingebrachte genen zich in het milieu zouden verspreiden. Ook incidentele consumptie, vraat en daarbij mogelijk optredende toxische of allergene effecten op mens en dier zijn onderwerp van de risicoanalyse. Bovendien worden eventuele effecten op niet-doelwitorganismen bestudeerd. Effecten op niet-doelwitorganismen zouden kunnen leiden tot verstoring van voedselketens of ecosystemen. Een eiwit kan mogelijk intact blijven in insecten, waarna het door insecten verspreid kan worden vanuit het proefveld. Mogelijke effecten op de bodemmicroflora zouden een verstoring in de nutriëntenkringloop in de bodem als gevolg kunnen hebben.

Teneinde de bovenstaande aspecten te kunnen beoordelen wordt een aantal factoren in ogenschouw genomen: de eigenschappen van het gastheerorganisme waarin de genen zijn ingebracht, de kenmerken van de ingebrachte genen, de mogelijke effecten van deze genen, de kenmerken van het ggo en de mogelijke interactie met het milieu waarin het ggo geïntroduceerd wordt.

De COGEM heeft eerder richtlijnen opgesteld voor de beoordeling van veldproefaanvragen met genetisch gemodificeerde planten.⁷ Teneinde mogelijke milieurisico's te voorkomen, worden in deze richtlijnen criteria beschreven voor een categorie-indeling van veldproeven. Wanneer weinig kennis beschikbaar is, worden alleen kleinschalige werkzaamheden toegelaten waarbij eventuele nadelige effecten verregaand ingeperkt moeten worden. Bij grootschalige veldproeven met minder inperkende voorschriften is meer kennis van het ggo vereist. Deze kennis kan bijvoorbeeld verkregen worden uit eerdere kleinschalige veldproeven of uit andere bronnen.

Eigenschappen van het gewas

De gecultiveerde appel (*M. pumila*)⁸ behoort tot de familie van de *Rosaceae*. Tot deze familie behoren ook andere fruitsoorten, zoals Peer (*Pyrus communis*), Aardbei (*Fragaria x ananassa*) en Framboos (*Rubus idaeus*).⁹ De huidige appelrassen zijn nauw verwant aan de wilde appelsoort *Malus sieversii*, de sierappelsoorten *Malus x asiatica*, *Malus baccata*, *Malus micromalus*, *Malus orientalis*, *Malus prunifolia* en de wilde Appel (*Malus sylvestris*).¹⁰

In Nederland is de gecultiveerde appel in boomgaarden en tuinen aangeplant, maar wordt de gecultiveerde appel daarnaast ook in verwilderde vorm aangetroffen in bossen en bermen.^{9,11,12} In Nederland zijn vanwege hun sierwaarde ook veel sierappels aangeplant. Veelgenoemde sierappelsoorten zijn *M. baccata*, *M. floribunda*, *Malus toringo* en *Malus tschonoskii*.^{11,13} Verder komt ook de wilde Appel (*M. sylvestris*) in Nederland voor.⁹ De wilde

Appel is een bedreigde boomsoort en komt hier alleen nog in kleine populaties of als individuele appelboom voor.^{11,14}

De gecultiveerde appel wordt professioneel vermeerderd op boomkwekerijen. Dit gebeurt door vegetatieve vermeerdering.¹⁵ Hiervoor wordt een stuk stengel op een onderstam geënt (in de winter) of wordt een oog op een onderstam geoculeerd (in de zomer). Uit de wortels van appel kunnen opslagplanten ontstaan.¹⁶

Appel is een kruisbestuiver en plant zich in de natuur meestal voort via seksuele voortplanting. Bij appelbomen duurt het ongeveer 3 tot 8 jaar voordat de appelboom voor het eerst gaat bloeien.^{17,18} De appelboom bloeit in april en mei.⁹ Het pollen wordt voornamelijk verspreid door insecten, maar kan ook via de wind verspreid worden.^{19,20}

De honingbij is het belangrijkste insect voor de bestuiving van appelbomen,^{19,20,21} maar ook solitaire bijen, hommels²⁰ en vliegen²² kunnen zorgen voor bestuiving. De afstand waarmee pollen door insecten wordt verspreid is afhankelijk van het foeragegedrag van de insecten.²⁰ Er zijn verschillende studies uitgevoerd naar de maximale afstand waarbij nog bevruchting plaats kan vinden. Al deze studies zijn uitgevoerd in boomgaarden. In een Canadese studie was de maximale afstand voor bevruchting tussen verschillende rijen appelbomen in de boomgaard 85,5 meter.²³ In een Duitse studie werd op een afstand van 104 meter nog bevruchting aangetroffen²⁰ en in een Japanse studie werd op 150 meter afstand van de pollenbron bevruchting aangetroffen.²⁴ Bij al deze studies moet worden opgemerkt dat de maximale afstand waarbij bevruchting werd aangetroffen de maximale afstand was waarbij nog waarnemingen werden gedaan. Het is daarmee niet uit te sluiten dat ook over grotere afstanden nog bevruchting plaats kan vinden.

Pollen van appel kan ook door de wind verspreid worden. Op 800 en 1200 meter afstand van een perenboomgaard werd nog pollen gevonden.¹⁹ Hierbij moet worden opgemerkt dat het onduidelijk is of dit pollen nog levensvatbaar was. Het pollen van de Peer is qua grootte vergelijkbaar met dat van appel²⁵. Waarschijnlijk kan pollen van appel ook dergelijke grote afstanden afleggen.

Appel is een kruisbestuiver die niet door zijn eigen pollen of door pollen van hetzelfde ras bestoven kan worden. Daarom bestaan appelboomgaarden vaak uit meerdere appelrassen. Soms worden sierappelsoorten aangeplant, die als bron van pollen voor bestuiving zorgen.^{20,26} De sierappelsoorten *Malus coronaria*, *M. floribunda*, *M. prunifolia*, *Malus niedzwetzkyana* en *Malus zumi* zijn o.a. kruisbaar met de gecultiveerde appel.²⁶ Kruising met sierappelsoorten kan leiden tot fertiele nakomelingen.²⁶ Verder leveren verschillende studies bewijs voor het bestaan van hybriden tussen de gecultiveerde appel en de wilde Appel (*M. sylvestris*).^{11,12,14,27} In Nederland zijn verschillende kruisbare verwanten van de gecultiveerde appel aanwezig. Zowel de wilde Appel (*M. sylvestris*) als verschillende sierappelsoorten (*M. baccata*, *M. coronaria*, *M. floribunda*, *M. micromalus*, *M. prunifolia*, *M. zumi*) komen in Nederland voor.^{9,11,13} In Nederland is het merendeel van de in het wild voorkomende appelbomen een hybride of bastaard appelboom.²¹

Appels worden gewoonlijk 3,5 tot 5 maanden na de bloei geoogst.¹⁵ Het vruchtvlies van de appel bestaat uit het weefsel van de moederplant en bevat dus alleen genen van de appelboom waaraan de appel wordt gevormd. Het vruchtvlies bevat geen genen die afkomstig zijn van

het pollen dat voor bevruchting heeft gezorgd. Het pollen kan wel via het zogenaamde 'metaxenia' effect de grootte, vorm, kleur en smaak van appels beïnvloeden.²⁸

Vogels kunnen schade aan de vruchten veroorzaken doordat ze de appels aanpikken.²⁹ Afgevallen appels worden gegeten door dieren zoals konijnen, hazen, dassen en muizen. Zowel vogels als zoogdieren kunnen appels en daarmee ook de zaden van de appel verspreiden.²¹ De grootste verspreider van appelzaad is de mens. Deze verspreidt het zaad door het weggooiën van klokhuizen. Na een koudeperiode van drie maanden kan het zaad dat in de klokhuizen aanwezig is ontkiemen. Uit weggegooide klokhuizen kunnen daarna gemakkelijk opslagplanten groeien.⁹ Het merendeel van de opslagplanten van appel die aan boskanten, langs sloten en in bermen teruggevonden kunnen worden is hoogstwaarschijnlijk ontstaan uit het zaad van weggegooide klokhuizen.²¹ Deze opslagplanten kunnen in sommige gevallen uitgroeien tot een volwassen appelboom. In bossen en bermen wordt de appelboom in verwilderde vorm aangetroffen.^{9,11,12}

Informatie over de ingebrachte sequenties

De appelbomen (alleen de bovenstam) zijn genetisch gemodificeerd m.b.v. *Agrobacterium tumefaciens*. Bij de modificatie is gebruik gemaakt van de pMF1 vector.

Op de backbone van deze vector liggen verschillende genen (*oriV* en *trfA*) die vermeerdering van het plasmide in de bacterie mogelijk maken. Daarnaast is ook het *nptIII* antibioticumresistentiegen op de backbone van de vector aanwezig.

Op het T-DNA gedeelte van de vector zijn naast het *HcrVf2* gen en het *nptII* antibioticumresistentiegen nog verschillende andere genen aanwezig (*rec-lbd* en *codA-nptII*). Deze genen maken deel uit van het R/Rs recombinatie systeem van *Zygosaccharomyces rouxii*. Dit recombinatie systeem bevat een m.b.v. dexamethason induceerbaar site-specifiek recombinase waardoor het mogelijk is om merker-vrije planten te verkrijgen. Na inductie van het recombinase, zorgt een negatief selectiesysteem ervoor dat alleen planten waarbij het *codA* gen door recombinatie is verwijderd, zullen overleven.

De aanvrager concludeert op basis van PCR resultaten dat de *nptII* en *nptIII* genen afwezig zijn.

De veldproef wordt uitgevoerd met drie typen ggo's. In dit advies wordt de door de aanvrager gebruikte benaming aangehouden.

- 1) cisgene appellijnen (o.a. SPVf2-11)
construct: rechter border, 288 bp eigen promotor, HcrVf2 coderende regio, 437 bp eigen terminator, 81 bp recombinatie site, linker border
- 2) cisgene appellijnen (o.a. CH12.1.49)
construct: rechter border, 242 bp eigen promotor, HcrVf2, 220 bp eigen terminator, recombinatie site afkomstig van Z. rouxii, linkerborder
- 3) intragene appellijnen (o.a. RbcVf2-11)
construct: rechter border, 1600 bp appel rubisco promotor, HcrVf2, 593 bp appel rubisco terminator, recombinatie site, linker border.

Onder cisgene planten verstaat de aanvrager planten die genetisch gemodificeerd zijn met DNA van de plantensoort zelf of met DNA van een van nature kruisbare soort. Het DNA dat voor de modificatie wordt gebruikt is bij cisgene planten in zijn geheel afkomstig van de gebruikte plantensoort en bestaat niet uit meerdere fragmenten. De 'cisgene' appellijnen die

bij de veldproef worden gebruikt, bevatten het *HcrVf2* gen met zijn eigen regulatiesignalen (promoter en terminator). Het *HcrVf2* gen is afkomstig van de kruisbare verwante sierappelsoort *M. floribunda*³⁰. Dit *HcrVf2* gen komt voortdurend tot expressie³² en de expressie van het gen wordt in aanwezigheid van de schimmel die Appelschurft veroorzaakt (*V. inaequalis*) verder verhoogd.³¹

Met intragene planten bedoelt de aanvrager ook planten die genetisch gemodificeerd zijn met DNA van de plantensoort zelf of met DNA van een van nature kruisbare soort, maar hierbij kan het DNA dat voor de modificatie wordt gebruikt uit meerdere fragmenten bestaan. De ‘intragene’ appellijnen die bij de veldproef worden gebruikt, bevatten het *HcrVf2* gen dat afkomstig is van de kruisbare verwante sierappelsoort *M. floribunda*.³⁰ De regulatiesignalen die de expressie van het *HcrVf2* gen controleren zijn afkomstig van het *rubisco* gen van appel. De promoter van het *rubisco* gen is actief in de groene delen van de plant en zorgt voor een hogere expressie. Het expressieniveau wordt door de aanwezigheid van *V. inaequalis* niet verder geïnduceerd.³¹

De appellijnen bevatten naast het *HcrVf2* gen en de regulatiesignalen die zorgen voor de expressie van dit gen, ook de rechter en linker border van *A. tumefaciens* en de recombinatie site van *Z. rouxii*.

De aanvrager stelt dat in de ‘cisgene’ appellijn SPVf2-11 twee kopieën van het T-DNA aanwezig zijn, terwijl in de ‘intragene’ appellijn RbcVf2-11 één kopie van het T-DNA aanwezig is. De resultaten van de experimenten waarbij het aantal kopieën is bepaald, zijn niet in het dossier aanwezig. Het was ten tijde van de vergunningaanvraag niet bij de aanvrager bekend hoeveel kopieën van het T-DNA in de overige ‘cisgene’ appellijnen (o.a. CH12.1.49) aanwezig zijn.

Eigenschappen van het HcrVf2 gen

Het *HcrVf2* gen is afkomstig van de wilde verwante sierappelsoort *M. floribunda* en bewerkstelligt resistentie tegen Appelschurft (*V. inaequalis*). Het gen is door traditionele veredeling in verschillende appelrassen zoals Santana, Topas en Florina, ingebracht. Het *HcrVf2* gen codeert voor een zogenaamd ‘receptor like protein’ en komt ook in afwezigheid van *V. inaequalis* tot expressie.³² In een appelras dat het *HcrVf2* gen bevat, worden bepaalde eiwitten die *V. inaequalis* produceert, herkend. Wanneer de aanwezigheid van *V. inaequalis* wordt opgemerkt, worden andere genen aangeschakeld die voor een afweerreactie zorgen. Deze afweerreactie zorgt ervoor dat de plantencellen waar herkenning plaats heeft gevonden doodgaan waardoor *V. inaequalis* zich niet verder kan verspreiden. Een hogere expressie van het *HcrVf2* gen is gecorreleerd met een betere resistentie tegen Appelschurft.^{31,30}

Proefopzet en monitoring na afloop

De gg-appelbomen zijn geënt op niet-genetisch gemodificeerde M9 onderstammen. De appelbomen worden geplant op een perceel dat deel uitmaakt van een grotere, omheinde en afgesloten proefveldlocatie. Het perceel met appelbomen is ter wering van reeën, hazen en andere grotere zoogdieren omheind met gaas. Ten noorden en ten oosten van het perceel met appelbomen is een elzenhaag aanwezig. Het oppervlak van het proefveld is maximaal 1750 m² inclusief manoeuvreerruimte voor de tractor.

Het snoeiafval en de door de gg-appelbomen gevormde appels worden verzameld en gecontroleerd afgevoerd en verbrand. Na afloop van de proef worden de bomen geroid en

verhakseld. Ook dit afval zal worden afgevoerd en verbrand. Na afloop van de proef wordt de grond gefreesd en in het daaropvolgende jaar wordt er gecontroleerd op opslag eventueel gevolgd door onkruidbestrijding.

De aanvrager hanteert een isolatieafstand van 150 meter. Binnen deze afstand worden geen appelbomen geteeld en bevinden zich ook geen andere losse appelbomen. Ook meldt de aanvrager dat binnen 500 meter afstand van het perceel geen andere appelboomgaarden aanwezig zijn. Verder zullen in de veldproef geen bijenkasten worden geplaatst voor bestuiving. De bloemen zullen met de hand worden bestoven.

Overwegingen en advies

Het huidige advies heeft betrekking op een vergunningaanvraag voor een kleinschalige categorie 1 veldproef met genetisch gemodificeerde schurftresistente appelbomen geënt op een niet-genetisch gemodificeerde onderstam. De schurftresistentie is verkregen door introductie van het *HcrVf2* gen afkomstig van de wilde verwante sierappelsoort *M. floribunda*. Dit *HcrVf2* gen is door traditionele veredeling ook in verschillende appelrassen, zoals Santana, geïntroduceerd.

Moleculaire karakterisering en gegevens in aanvraag summier

De gegevens die in de aanvraag aanwezig zijn over de functie van de genen die op de vector aanwezig zijn en het gebruikte recombinatiesysteem zijn erg summier. De aanvrager concludeert op basis van PCR-resultaten dat de *nptII* en *nptIII* antibioticaresistentiegenen afwezig zijn. De PCR's zijn uitgevoerd zonder interne positieve controle. Hierdoor valt niet uit te sluiten dat de PCR's een vals negatief resultaat hebben opgeleverd en zouden de antibioticumresistentiegenen *nptII* en *nptIII* onbedoeld toch in de gg-appelbomen aanwezig kunnen zijn.

Betreffende de aanwezigheid van het *nptIII* gen kan het volgende worden opgemerkt. Bij de productie van de gg-appelbomen is het R/Rs recombinatiesysteem gebruikt om een gedeelte van het T-DNA te verwijderen. Op dit gedeelte ligt o.a. het *nptIII* gen. Een negatief selectiesysteem zorgt ervoor dat alleen planten waarbij de recombinatie is gelukt kunnen overleven. Hoewel de COGEM van mening is dat de resultaten van de PCR geen uitsluitsel geven over de aan- of afwezigheid van het *nptIII* gen, is het gezien het gebruikte recombinatie- en selectiesysteem niet waarschijnlijk is dat het *nptIII* gen in de gg-appelbomen aanwezig is.

Verspreiding van ingebrachte gen via zaad is niet uitgesloten

Zaad van appels wordt verspreid door zowel vogels als zoogdieren.²¹ Het proefveld is omheind met gaas en maakt deel uit van een afgesloten proefveldlocatie. De COGEM is van mening dat door de afgesloten proefveldlocatie en de omheining van het proefveld het consumeren van appels en het verspreiden van appelzaad door zoogdieren voldoende wordt voorkomen. Er zijn geen maatregelen getroffen om verspreiding van het zaad door vogels te voorkomen. Na een koudeperiode kan verspreid zaad ontkiemen en uitgroeien.

Bevruchting van (wilde) verwante soorten met genetisch gemodificeerd pollen is niet uitgesloten

In Nederland wordt appel veelvuldig gecultiveerd. De gecultiveerde appel komt ook in verwilderde vorm voor aan boskanten, langs sloten en in bermen. Daarnaast komen verschillende sierappelsoorten in Nederland voor. Ook de wilde Appel, die beschouwd wordt

als een bedreigde boomsoort, wordt in Nederland aangetroffen. Zowel de wilde Appel als verschillende sierappelsoorten zijn kruisbaar met de gecultiveerde appel.

Zoals eerder gemeld wordt het pollen van appelbomen verspreid via bijen, hommels en vliegen.^{19,20,21,22} Bij een in de literatuur gerapporteerd experiment bleek op 150 meter afstand van een pollenbron nog bevruchting plaats te vinden.²⁴ Ook werd op 800 en 1200 meter afstand van een perenboomgaard nog pollen gevonden. Naar verwachting zal ook het pollen van appel, dat vergelijkbaar van grootte is, dergelijke afstanden kunnen afleggen.¹⁹ De aanvrager hanteert een isolatieafstand van 150 meter en meldt dat op een afstand van 500 meter geen appelboomgaarden voorkomen.

De COGEM is van mening dat het bij de gehanteerde isolatieafstand niet is uit te sluiten dat uitkruising plaatsvindt met (verwilderde) appelbomen, de wilde Appel of met andere verwante kruisbare sierappelsoorten. Na bevruchting van kruisbare verwanten met genetisch gemodificeerd (gg-) pollen kunnen appels ontstaan. Wanneer appels worden gevormd kan het zaad in de appels na een koudeperiode ontkiemen en uitgroeien.

Met betrekking tot eventuele bevruchting van gecultiveerde appelbomen valt het volgende op te merken. Het vruchtvlees van de appel bestaat uit het weefsel van de moederplant. Wanneer een gecultiveerde appelboom met het gg-pollen wordt bevrucht dan zal het vruchtvlees het *HcrVf2* gen van de gg-appelbomen niet bevatten. Het pollen kan zoals gebruikelijk via het zogenaamde 'metaxenia' effect wel de grootte, vorm, kleur en smaak van appels beïnvloeden.²⁸ Het 'metaxenia' effect dat het gg-pollen zou kunnen veroorzaken zal naar verwachting overeenkomen met dat van andere appelrassen waarin het *HcrVf2* gen aanwezig is. Eventueel zaad dat na bevruchting met gg-pollen ontstaat zal niet gebruikt worden voor het opkweken van nieuwe appelbomen. Appelbomen die in boomgaarden worden geplant zijn afkomstig van boomkwekerijen en worden professioneel vermeerderd.

Geen verspreiding via vegetatieve delen

Uit de wortels van appelbomen kunnen opslagplanten ontstaan. Eventuele opslagplanten die bij de in de veldproef gebruikte appelbomen ontstaan, zullen afkomstig zijn van de niet-genetisch gemodificeerde onderstam.

Geen aanwijzingen voor negatieve effecten op niet-doelwitorganismen

Niet-doelwitorganismen kunnen in aanraking komen met het *HcrVf2* eiwit door contact met de genetisch gemodificeerde delen van de appelboom. De gebruikte onderstam is niet genetisch gemodificeerd. Excretie van het *HcrVf2* eiwit via de wortels is hierdoor niet waarschijnlijk. Micro-organismen in het bodemecosysteem kunnen wel worden blootgesteld aan het *HcrVf2* eiwit door afgevallen en rottende bladeren.

Er zijn geen aanwijzingen dat het *HcrVf2* eiwit een negatief effect heeft op niet-doelwitorganismen. Het *HcrVf2* gen codeert voor een receptor die *V. inaequalis*, de schimmel die Appelschurft veroorzaakt, specifiek herkent. De specificiteit van de receptor blijkt uit het gegeven dat het appelras Santana, dat het *HcrVf2* gen bevat, gevoelig is voor aantasting met de Appelmeeldauw schimmel (*Podosphaera leucotricha*).³³

In een studie met vier typen transgene en niet-transgene appelbomen die het *HcrVf2* gen al dan niet bevatten, werd geen effect gevonden van de aanwezigheid van het *HcrVf2* gen op het aantal uitgekomen Appelvouwmijnmotten (*Phyllonorycter blancardella*) en de ontwikkelingsduur van de Appelvouwmijnmot. Ook werd er geen effect gevonden op de

ontwikkelingsduur van diens parasiet (*Pholetesor circumscriptus*) en op de mate waarbij parasitisme plaatsvond.³⁴

Het *HcrVf2* gen is door traditionele veredeling in appelrassen zoals Santana ingekruisd. In Nederland wordt het appelras Santana op ongeveer 10 hectare geteeld.³⁵ Ook andere appelrassen met het *HcrVf2* gen, zoals Florina en Topaz worden in Nederland geteeld. In de beschikbare literatuur is geen melding gemaakt van nadelige effecten op mens of milieu die door de teelt van deze appelrassen werden veroorzaakt.

Geen aanwijzingen voor rol HcrVf2 bij allergeniteit

Het Mal d1 eiwit, dat bij afweerreacties van de appel betrokken is, is verantwoordelijk voor allergeniteit van appels bij mensen.³⁶ Het *HcrVf2* gen codeert voor een receptor, die *V. inaequalis*, de schimmel die Appelschurft veroorzaakt, herkent. Na herkenning wordt een afweerreactie in gang gezet. Er is geen indicatie dat de aanwezigheid van het *HcrVf2* gen met allergeniteit is geassocieerd, want het via traditionele veredeling verkregen appelras Santana dat ook het *HcrVf2* gen bevat, is hypo-allergeen.³⁷ Bij een studie naar de hypo-allergeniteit van Santana appels bleek 53% van de proefpersonen met appelallergie nauwelijks tot geen allergische klachten te krijgen na het consumeren van een Santana appel.³⁷

Bij sommige van de gg-appelbomen staat het *HcrVf2* gen onder controle van de regulatiesignalen van het *rubisco* gen van appel. Hierdoor wordt de expressie van het *HcrVf2* gen, dat codeert voor een specifieke receptor, verhoogd. Aangezien de aanwezigheid van het *HcrVf2* gen niet met allergeniteit is geassocieerd,³⁷ is er geen reden om aan te nemen dat een verhoogde expressie van dit gen tot allergeniteit zal leiden. Appels die door de gg-appelbomen worden geproduceerd zijn niet bedoeld voor consumptie en zullen worden vernietigd.

Wanneer appelbomen uit een boomgaard door gg-pollen worden bevrucht dan zal het vruchtvlees van de ontstane appels het *HcrVf2* gen niet bevatten. Eventueel zaad dat na bevruchting met gg-pollen ontstaat zal niet gebruikt worden voor het opkweken van nieuwe appelbomen.

Aanwezigheid van transgene sequenties veroorzaakt geen milieurisico

De gg-appelbomen bevatten behalve het *HcrVf2* gen ook enkele transgene sequenties. In de gg-appelbomen zijn T-DNA borders aanwezig die afkomstig zijn van *A. tumefaciens* en noodzakelijk zijn voor de transformatie. De COGEM heeft eerder geconcludeerd dat het zeer onwaarschijnlijk is dat de insertie van korte DNA fragmenten, zoals een T-DNA border, tot milieurisico's leidt.³⁸ Bij de productie van de gg-appelbomen is verder gebruik gemaakt van het R/Rs recombinatiesysteem van *Z. rouxii*. Bij dit recombinatiesysteem blijft in de gg-appelbomen een recombinatiesite achter, die tussen de 59 en 82 baseparen groot kan zijn, maar meestal 82 baseparen lang is.³¹ Deze recombinatiesite bestaat uit niet-coderende sequenties. Derhalve worden er geen nieuwe eigenschappen in de plant gebracht. Daarom is het zeer onwaarschijnlijk dat de aanwezigheid van deze recombinatiesite tot milieurisico's zal leiden.

Eventuele aanwezigheid van nptIII antibioticumresistentiegen levert geen milieurisico op

Op basis van de door de aanvrager aangeleverde gegevens kan niet worden uitgesloten dat het *nptIII* antibioticumresistentiegen onbedoeld toch in de gg-appelbomen aanwezig is. De COGEM heeft eerder geconcludeerd dat de aanwezigheid van het *nptIII*

antibioticumresistentiegen bij veldproeven geen onaanvaardbaar milieurisico veroorzaakt.³⁹ Het *nptIII* gen staat onder controle van prokaryote regulatiesignalen en zal daardoor niet in appelbomen tot expressie komen. De kans op horizontale overdracht (tussen gg-plant en bacterie) van de betreffende antibioticumresistentiegenen acht de COGEM zeer gering, omdat deze alleen onder bijzondere laboratoriumomstandigheden, maar nog nooit in de praktijk is waargenomen. Daarnaast komt het *nptIII* gen veelvuldig in het milieu voor. De zeer geringe (theoretische) kans op een eventuele genoverdracht van plant op bacterie zal daarom niet leiden tot extra milieurisico.

De COGEM signaleerde eerder wel dat de aanwezigheid van antibioticumresistentiegenen uit het oogpunt van risicoperceptie onwenselijk kan worden geacht.³⁹

Conclusie

De COGEM is van mening dat met de voorgenomen inperkingsmaatregelen uitkruising en verspreiding van het ingebrachte gen niet voorkomen zal worden. Zij verwacht echter niet dat verspreiding van het *HcrVf2* gen tot milieurisico's zal leiden. Het *HcrVf2* gen codeert voor een receptor, die *V. inaequalis*, de schimmel die Appelschurft veroorzaakt, specifiek herkent. Het *HcrVf2* gen is afkomstig van een kruisbare verwante sierappelsoort (*M. floribunda*) en werd eerder door traditionele veredeling in verschillende andere appelrassen (bijvoorbeeld Santana) geïntroduceerd. Het *HcrVf2* gen is dus in kruisbare verwanten van de gecultiveerde appel, in via traditionele veredeling verkregen appelrassen en in de wilde populatie aanwezig. Er is geen indicatie dat de aanwezigheid van het *HcrVf2* gen in appelrassen met allergeniteit is geassocieerd. In de beschikbare literatuur is geen melding gemaakt van nadelige effecten op mens of milieu die door de teelt van deze appelrassen werden veroorzaakt.

Op de bij de transformatie gebruikte vector zijn naast het *HcrVf2* gen verschillende andere genen aanwezig. De vector bevat o.a. de antibioticumresistentiegenen *nptII* en *nptIII*. De experimenten waaruit de aanvrager afleidt dat deze genen niet in de gg-appelbomen aanwezig zijn, missen de noodzakelijke controles. Op basis van het gebruikte recombinatiesysteem acht de COGEM de kans dat het *nptII* gen in de gg-appelbomen aanwezig is verwaarloosbaar klein. Op basis van de aangeleverde gegevens kan echter niet worden uitgesloten dat het *nptIII* gen in deze appelbomen is ingebracht. De COGEM heeft eerder geconcludeerd dat bij een veldproef een eventuele aanwezigheid van het *nptIII* antibioticumresistentiegen geen milieurisico zal veroorzaken.³⁹

Gezien het bovenstaande concludeert de COGEM dat de veldproef kwalificeert voor een categorie 2 veldproef en voldoet aan de hiervoor geldende eisen.⁷

Anderzijds stelt de aanvrager dat het *nptIII* gen in de gg-appelbomen afwezig is. De aangeleverde gegevens zijn niet overtuigend omdat de noodzakelijke controles ontbreken. Mede gezien de maatschappelijke discussie omtrent de aanwezigheid van antibioticumresistentiegenen in genetisch gemodificeerd planten is de COGEM van mening dat de conclusie omtrent de afwezigheid van het *nptIII* gen van een goede onderbouwing zou moeten zijn voorzien. Daarom adviseert de COGEM om aanvullende gegevens te vragen. Een eventuele aanwezigheid van het *nptIII* gen zal naar mening van de COGEM echter geen milieurisico veroorzaken. De gegevens over de afwezigheid van het *nptIII* gen maken daarom geen deel uit van de milieurisico overweging van de COGEM over deze veldproef.

Gezien het bovenstaande heeft de COGEM tegen de in de aanvraag beschreven werkzaamheden geen bezwaar en acht zij de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. COGEM (1998). BGGO 98-06 Oculatie van genetisch gemodificeerde schimmelresistente appel (*Malus pumila*). Advies CGM/980629-06
2. COGEM (2000). BGGO 00/04 Toetsing van genetisch gemodificeerde appelbomen met verhoogde schimmelresistentie in het veld. Advies CGM/000721-03
3. COGEM (2003). Ontwerpbeschikking BGGO 02/03 Toetsing van genetisch gemodificeerde niet-bloeiende appelbomen met verhoogde schimmelresistentie in het veld. Advies CGM/030127-05
4. COGEM (2003). Oculatie van genetisch gemodificeerde, schimmelresistente, appel. Advies CGM/031124-03
5. COGEM (2004). Veldproef met genetisch gemodificeerde niet-bloeiende appelbomen met verhoogde schimmelresistentie. Advies CGM/041123-01
6. COGEM (2002). Staande landbouw en klassieke veredeling als referentiekader. Advies CGM/021017-06
7. COGEM (2008). Aanpassing van advies over de indeling van veldwerkzaamheden met genetisch gemodificeerde planten. Advies CGM/081125-02
8. Mabblerley DJ, Jarvis CE & Juniper BE (2001). The name of the apple. *Telopea* 9(2):421-430
9. Van der Meijden R. (2005). Heukels' flora van Nederland, 23e druk, Wolters-Noordhoff, Groningen
10. Velasco R, Zharkikh A & Affourtit J (2010). The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Nat genet.* 42:10, 833-839
11. Coart E, Vekemans X & Smulders M.J.M. (2003). Genetic variation in the endangered wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) in Belgium as revealed by amplified fragment length polymorphism and microsatellite markers. *Mol Ecol.* 12:845-857
12. Coart E, Van Glabeke S, De Loose M *et al.* (2006). Chloroplast diversity in the genus *Malus*: new insights into the relationship between the European wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) and the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh.) *Mol Ecol.* 15: 2171-2182
13. Sierappels (Malus). www.mwiarda.nl/appeltern/sierappel.doc (15 november 2010)
14. Koopman WJM, Li Y, Coart E *et al.* (2007). Linked vs. unlinked markers: multilocus microsatellite haplotype-sharing as a tool to estimate gene flow and introgression. *Mol Ecol.* 16: 243-256
15. Crop Protection Compendium (2007). Apple. CD-ROM edition, © Cab International 2007, Nosworthy way, Wallingford, UK
16. Vragen & antwoorden: bomen. www.neerlandstuin.nl/v_a/vabomen3.html (22 november 2010)
17. Acquaah G (2007). Principles of plant genetics and breeding. Blackwell publishing. ISBN-10:1-4051-3646-4
18. McDonald MB & Kwong FY (eds) (2005). Flower seeds: biology and technology. CABI Publishing ISBN 0-85199-906-9
19. Wertheim SJ (1968) Nieuwe inzichten in de bestuiving van appel en peer. Mededelingen van de Directie Tuinbouw 31:438-447
20. Reim S, Flachowsky H, Michael M *et al.* (2006). Assessing gene flow in apple using a descendant of *Malus sieversii* var. *sieversii* f. *niedzwetzyana* as an identifier for pollen dispersal. *Environ biosafety Res* 5: 89-104
21. Weeda EJ, Westra R, Westra CH *et al.* (1987). Nederlandse oecologische Flora. Wilde planten en hun relaties 2. KNNV Uitgeverij/IVN ISBN 90-5011-180-7
22. Williams RR & Smith BD (1967) VII. Observations on factors influencing the effective distance of pollinator trees in 1966 *Ann. Rpt. Long Ashton Agr. and Hort Res. Sta* 1966 126-134
23. Kron P, Husband BC & Kevan PG (2001). Across- and along-row pollen dispersal in high-density apple orchards: insights from allozyme markers. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 76(3):286-294
24. Soejima J (2007) Estimation of gene flow via pollen spread for the orchard layout prior to the field release of apple transformants. *Acta Hort* 738: 341-344
25. Van der Ham RWJM, Kaas JP, Kerkvliet JD *et al.* (1999) Pollenanalyse – stuifmeelonderzoek van honing voor imkers, scholen en laboratoria. Uitgave Stichting Landelijk Proefbedrijf voor Insektenbestuiving en Bijenhouderij Ambrosiushoeve, Hilvarenbeek
26. Sestras RE, Dan C, Pamfil D *et al.* (2010) The variability of juvenile period, fruits size and response to diseases attack on F1 interspecific apple hybrids and the efficiency of selection. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 38(1): 234-240
27. Larsen AD, Asmussen CB, Coart E *et al.* (2006). Hybridization and genetic variation in Danish populations of European crab apple (*Malus sylvestris*). *Tree Genetics & Genomes* 2: 86-97

28. Bodor P, Gaál M & Tóth M (2008). Metaxenia in apples cv. 'Rewena', 'Relinda', 'Baujade' as influenced by scab resistant pollinizers. *International Journal of Horticultural Science* 14 (3): 11-14
29. Faunafonds Maatregelen – Fruit- Appels en peren. www.faunafonds.nl/index.asp?p=217 (22 november 2010)
30. Belfanti E, Silfverberg-Dilworth E, Tartarini S *et al.* (2004). The *HcrVf2* gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101(3): 886-890
31. Joshi SG (2010) Towards durable resistance to apple scab using cisgenes. PhD Thesis Wageningen University
32. Kruijt M, De Kock MJD & De Wit PJGM (2005). Review. Receptor-like proteins involved in plant disease resistance. *Mol Plant Pathol*. 6(1): 85-97
33. Resistance management in Vf apple scab resistant organic apple orchards. <http://orgprints.org/8837> (24 november 2010)
34. Vogler U, Rott AS, Gessler C *et al.* (2010) How transgenic and classically bred apple genotypes affect non-target organisms on higher trophic levels. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 134: 114-121
35. De hypoallergene Santana appel – gangbare en biologische teelt. www.santana-appel.nl/teelt.php (8 december 2010)
36. Degenhardt J, Al-Masri AN, Kürkcüoglu S *et al.* (2005). Characterization by suppression subtractive hybridization of transcripts that are differentially expressed in leaves of apple scab-resistant and susceptible cultivars of *Malus domestica*. *Mol. Genet. Genomics* 273: 326-335.
37. Kootstra HS, Vlieg-Boerstra BJ & Dubois AEJ (2007). Assessment of the reduced allergenic properties of the Santana apple. *Annals of allergy, asthma & immunology* 99:522-525
38. COGEM (2008). Cisgenese en voedselveiligheidsbeoordeling. COGEM Signalering CGM/081028-04
39. COGEM (2007). Gebruik van antibioticumresistentiegenen in genetische gemodificeerde gewassen voor veldproeven. Advies CGM/070703-01