

Voorzitter: prof.dr.ir. B.C.J. Zoeteman

Cogem
Posbus 578
3720 AN Bilthoven

Aan de Staatssecretaris van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening
en Milieubeheer
De heer drs. P.L.B.A. van Geel
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

Uw kenmerk
IM 05-004.co1

Uw brief van
28 oktober 2005

Kenmerk
CGM/051206-02

Datum
6 december 2005

Onderwerp
conceptadvies ontwerpbeschikking DGM/SAS IM 05-004

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van de adviesvraag over de ontwerpbeschikking DGM/SAS IM 05-004 en de vergunningaanvraag, getiteld 'Application for the release into the environment of potatoes with altered starch composition (I) according to the Genetically Modified Organisms Decree', van BASF Plant Science, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de milieurisico's van kleinschalige (klasse twee) veldproeven met genetisch gemodificeerde aardappelen (*Solanum tuberosum*) met een verlaagd amylopectinegehalte. Het doel van de voorgenomen werkzaamheden is het bestuderen van het zetmeelgehalte en de zetmeelsamenstelling in knollen onder veldomstandigheden.

De aardappel kan in Nederland niet uitkruisen naar wilde verwanten. De aardappel kan wel uitkruisen naar andere cultuurrassen, maar de kans hierop is zeer beperkt. De knollen zijn vorstgevoelig en zullen de Nederlandse winter gewoonlijk niet overleven. In de noodzaak om eventuele aardappelopslag uit zaad of achterbleven knollen te verwijderen wordt in het kader van de verplichte bestrijding van *Phytophthora infestans* voorzien. De COGEM is verder van mening dat aan alle criteria die gesteld worden aan een klasse twee experiment wordt voldaan. Bij eventuele opschaling van de veldproef acht de COGEM het noodzakelijk dat gegevens over vorsttolerantie worden verstrekt.

De COGEM heeft tegen de in de aanvraag beschreven werkzaamheden, onder de voorgestelde voorwaarden, geen bezwaar en acht de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

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 stylized loop followed by a horizontal line and a small dash.

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

c.c. Dr. ir. B.P. Loos
Dr. I. van der Leij

Titel: Kleinschalige veldproef met genetisch gemodificeerde aardappelplanten met een verlaagd amylopectinegehalte

COGEM advies: CGM/051206-02

1. Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de milieurisico's van kleinschalige veldproeven met genetisch gemodificeerde aardappelen (*Solanum tuberosum*) met een veranderd zetmeelgehalte. BASF Plant Science is voornemens aardappelplanten met een veranderde zetmeelsamenstelling in de knollen te bestuderen en heeft hiertoe twee verschillende aanvragen ingediend: IM 05-004 en IM 05-005. Daarnaast heeft BASF Plant Science een veldproefaanvraag ingediend voor aardappelen met een verhoogde ziekteresistentie tegen *Phytophthora infestans*; IM 05-003. De COGEM adviseert over elk van de drie afgegeven ontwerpbeschikkingen (CGM/051206-01, CGM/051206-02 en CGM/051206-03).

De onderhavige vergunningaanvraag heeft betrekking op kleinschalige (klasse twee) werkzaamheden met genetisch gemodificeerde aardappelplanten in de gemeente Borger-Odoorn en Lingewaard. In aardappelen komen twee soorten zetmeel voor, amylopectine en amylose. De aanvraag omvat aardappelen waarbij de vorming van amylopectine geremd wordt. De aanvrager verwacht dat door gebruik van genetisch gemodificeerde aardappelen de amylosewinning vereenvoudigd zal worden wat leidt tot een verminderd verbruik van chemicaliën, water en energie.

Deze vergunningaanvraag betreft aardappelplanten, waarin fragmenten van twee genen (*be1* en *be2*) zijn ingebracht, die coderen voor vertakkingsenzymen (branching enzyme EC 2.4.1.8) en betrokken zijn bij de synthese van amylopectine. Fragmenten van deze twee genen zijn onderdeel van één genconstruct. Het genconstruct is zowel in 'antisense' oriëntatie als in 'sense' oriëntatie ingebracht waardoor een 'inverted repeat' configuratie ontstaat. Dit resulteert in onderdrukking van de expressie van de in de plant aanwezige *be1* en *be2* genen hetgeen een verlaging van het amylopectinegehalte in knollen tot gevolg heeft.

Voorgaande COGEM adviezen

De COGEM heeft in het verleden positief geadviseerd over een vergunningaanvraag met soortgelijke genetisch gemodificeerde aardappelen (CGM/040303-03 en CGM/040517-03). Het betrof hier een klasse 1 veldexperiment.

2. Milieurisicoanalyse

Bij de risicobeoordeling van introductie in het milieu van genetisch gemodificeerde organismen (ggo's), zoals die door de COGEM wordt uitgevoerd, wordt gekeken naar

de effecten die het ggo kan hebben op mens en milieu (waarbij de mens als integraal onderdeel van het milieu wordt beschouwd).

Onder risico wordt verstaan de combinatie van de gevolgen van een gevaar en de kans dat deze gevolgen zich kunnen voordoen. De mogelijke schadelijke effecten van (toepassing van) een ggo worden vergeleken met die van het ongemodificeerde organisme (de zogenaamde 'baseline') waaruit het ggo is afgeleid. Bij introductie in het milieu wordt door de COGEM de staande landbouw en de klassieke veredeling als 'baseline' voor genetische gemodificeerde gewassen gebruikt (CGM/021017-06).

De uitgangspunten en de methodiek van de milieurisicobeoordeling is in de EU richtlijn 2001/18/EG en de bijbehorende bijlagen beschreven. Hierin is vastgelegd dat bij de milieurisicobeoordeling zowel gekeken wordt naar mogelijk 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 mogelijke gevolgen van het mogelijk optreden van schadelijke effecten; de 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 algeheel risico van het ggo.

Bij de voorliggende aanvraag kijkt de COGEM naar de risico's voor mens en milieu die verbonden zijn aan de introductie in het milieu van genetische gemodificeerde aardappelplanten met een verlaagd amylopectinegehalte. Zowel directe als indirecte effecten worden beoordeeld. Hierbij is de kans op verspreiding door pollen of zaden, het eventueel uitkruisen van aardappel 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 verspreiding van de ingebrachte genen in het milieu zou optreden. Ook incidentele consumptie of vraat en mogelijke toxische of allergene effecten op mens en dier zijn onderwerp van de risicoanalyse. Effecten op niet-doel organismen zouden kunnen leiden tot een verstoring van voedselketens of ecosystemen. Een eiwit kan mogelijk intact blijven in insecten, waarna het door insecten verspreid kan worden vanuit het proefveld. Mogelijke schadelijke effecten op de bodemmicroflora zouden als gevolg een verstoring in de nutriëntenkringloop in de bodem kunnen hebben.

Teneinde de bovenstaande aspecten te kunnen beoordelen wordt een aantal factoren in ogenschouw genomen: de eigenschappen van het gastheerorganisme waarin de transgenen zijn ingebracht, de kenmerken van de ingebrachte transgenen, 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 (CGM/990518-41). In deze

richtlijnen worden criteria beschreven voor een klassenindeling van veldproeven teneinde mogelijke milieurisico's te voorkomen. Indien weinig kennis beschikbaar is, worden alleen kleinschalige werkzaamheden toegelaten waarbij eventuele nadelige effecten verregaand ingeperkt moeten worden. Voor grootschalige veldproeven met minder inperkende voorschriften is meer kennis van het ggo vereist. Deze kennis kan eventueel verkregen worden uit eerdere kleinschalige veldproeven, of andere bronnen.

Het veldexperiment in de onderhavige aanvraag betreft een klasse twee veldexperiment. Dit houdt in dat de jaarlijkse maximale omvang van de proef vijf hectare bedraagt op vijf locaties, waarbij elke locatie niet groter mag zijn dan één hectare. In de onderhavige aanvraag wordt verzocht om de werkzaamheden te mogen uitvoeren op maximaal twee locaties per jaar.

Eventuele effecten moeten bij een klasse twee experiment beperkt blijven tot het proefobject. Daarnaast moet opslag worden verwijderd tot één jaar na het laatste jaar dat opslag is waargenomen.

2.1 Eigenschappen van het gewas

De aardappelplant (*S. tuberosum*) behoort tot de familie van de *Solanaceae* waartoe ook de tomaat, aubergine, tabak en peper behoren en is als landbouwgewas afkomstig uit Zuid-Amerika (1). *S. tuberosum* is onderverdeeld in twee ondersoorten: *tuberosum* en *andigena*. De ondersoort *tuberosum* wordt in Europa geteeld. De aardappel komt in de Nederlandse flora niet voor, wel heeft zij wilde verwanten: de zwarte nachtschade, (*S. nigrum* subsp. *nigrum*), de beklierde nachtschade (*S. nigrum* subsp. *schultesii*), bitterzoet (*S. dulcamara*), glansbes nachtschade (*S. physalifolium*) en driebloemige nachtschade (*S. triflorum*) (2). In Nederland vormt aardappel een belangrijk akkerbouwgewas, waarbij de geteelde variëteiten zijn onder te verdelen in consumptieaardappels en zetmeelaardappels. De laatste categorie wordt met name in noordoost Nederland geteeld.

Aardappel kent de volgende structuren voor verspreiding en overleving: pollen, zaden en knollen. In haar natuurlijke ecosysteem en in de meeste ecosystemen waarin de aardappel als cultuurgewas wordt toegepast, vindt vrijwel altijd knolvorming en in de meeste gevallen ook bloei plaats. In Nederland wordt de aardappel vegetatief vermeerderd. Aardappelknollen zijn koudegevoelig en overleven de winter in Nederland gewoonlijk niet. Alleen tijdens zachte winters zijn de aardappelknollen in staat te overleven en het volgende jaar uit te lopen (4).

De pollenkorrels van aardappel zijn relatief zwaar en worden verspreid via insecten, met name hommels. Zowel kruis- als zelfbevruchting komt voor bij aardappel al vindt er hoofdzakelijk zelfbestuiving plaats (80-100%) (3). Windbestuiving speelt geen rol van betekenis. Uitkruising met in Nederland voorkomende wilde verwanten van de aardappel is niet mogelijk (4). Tot op heden zijn er in Europa nog geen levensvatbare hybriden gevonden in natuurlijke systemen (5). Uitkruising naar

andere gecultiveerde aardappelrassen is wel mogelijk (4).

Zaden worden niet door vogels verspreid. De zaden die eventueel worden gevormd door cultuuraardappelen worden niet gebruikt, omdat bij de vermeerdering pootaardappelen worden gebruikt in plaats van zaden. Ook worden de eventuele zaden niet benut voor andere toepassingen. Er is aangetoond dat op een perceel zaden kunnen achterblijven die levensvatbaar zijn (6,7). Op basis van de ervaringen in de gangbare praktijk wordt verwacht dat een deel van deze zaden in staat is om de winter te overleven en te kiemen. Het loof van de aardappelen, inclusief de bloeiwijzen, met eventuele zaden wordt gewoonlijk voor de oogst afgedood en wordt verder niet benut.

2.2 Eigenschappen van de ingebrachte genen

De aardappelplanten zijn genetisch gemodificeerd met behulp van *Agrobacterium tumefaciens*, waarbij gebruik is gemaakt van twee vectoren: pHAS3 of pHASHS5. Beide vectoren zijn afgeleid van pPZP200.

pHAS3 bevat de volgende DNA-sequenties:

- een knolspecifieke promotor van het *kgz* gen, afkomstig uit *S. tuberosum*;
- fragmenten van *be1* gen en *be2* gen in een genconstruct, coderend voor vertakkingsenzymen, afkomstig uit *S. tuberosum*. Het genconstruct is in 'sense' oriëntatie gekloneerd en vervolgens is hetzelfde genconstruct in 'antisense' oriëntatie gekloneerd waardoor een 'inverted repeat' ontstaat;
- *Tnos*, de terminator van het nopalinesynthasegen uit *A. tumefaciens*;
- *Pnos*, constitutieve promotor, afkomstig van *A. tumefaciens*;
- *ahas* gen, coderend voor acetohydroxyzuur synthase, afkomstig van *Arabidopsis thaliana*.

pHASHS5 bevat de volgende DNA-sequenties:

- een knolspecifieke promotor van het *kgz* gen, afkomstig uit *S. tuberosum*;
- fragmenten van *be1* gen en *be2* gen in een genconstruct, coderend voor vertakkingsenzymen, afkomstig uit *S. tuberosum*. Het genconstruct is in 'sense' oriëntatie gekloneerd en vervolgens is hetzelfde genconstruct in 'antisense' oriëntatie gekloneerd waardoor een 'inverted repeat' ontstaat. Tussen de twee genconstructen bevindt zich een spacer met een fragment van *be2* promotor sequentie;
- *StGH1*, coderend voor een eiwit dat de zetmeelbiosynthese stimuleert, afkomstig van *S. tuberosum*;
- *Tnos*, de terminator van het nopalinesynthasegen uit *A. tumefaciens*;
- *Pnos*, constitutieve promotor, afkomstig van *A. tumefaciens*;
- *ahas* gen, coderend voor acetohydroxyzuur synthase, afkomstig van *A. thaliana*.

Beide vectoren die gebruikt zijn voor de genetische modificatie bevatten tevens het antibioticumresistentiegen *aadA*. Dit gen wordt gebruikt als selectiemarker bij

transformatie-experimenten. Expressie van het gen resulteert in resistentie tegen spectinomycine. Het *aadA* gen is geplaatst op de 'backbone' sequentie van de vector en zal niet in het genoom van planten worden ingebouwd. Naast de bovengenoemde genen bevat pHAS3 en pHASHS5 enkele regulatoire sequenties. Alleen planten waarvan aangetoond is dat die geen vectorsequenties bevatten zullen in de veldexperimenten gebruikt worden.

Beide *be*-genen coderen voor vertakkingsenzymen (branching enzyme EC 2.4.1.8) die betrokken zijn bij de synthese van amylopectine. Deze genen zijn van nature al aanwezig in de aardappelplant. De constructen zijn zodanig ontworpen dat transcriptie wel zal plaatsvinden maar, translatie (omzetting van RNA naar eiwit) van de gevormde transcripten waarschijnlijk niet zal plaatsvinden, als gevolg van de 'inverted repeat' oriëntatie. Dit leidt tot interne hybridisatie van de RNA transcripten, waarbij secundaire structuren gevormd worden die translatie van die transcripten onmogelijk maakt (8, 9). Als gevolg van de vorming van deze secundaire structuren zijn de transcripten gevoeliger voor intracellulaire degradatieprocessen. Deze processen worden verondersteld de basis te zijn voor het opgewekte 'antisense' effect en daardoor voor de remming van amylosevorming in onderhavige aardappelplanten (10, 11, 12).

De genetisch gemodificeerde aardappelplanten bevatten tevens een gemuteerd *ahas* gen dat codeert voor acetohydroxyzuur synthase. Het enzym katalyseert de eerste syntheses stap van de aminozuren valine, leucine en isoleucine. De werking van een aantal herbiciden is gebaseerd op verstoring van dit enzym waardoor de vorming van deze aminozuren verhinderd wordt en de plant zal afsterven. Mutaties in het *ahas* gen kunnen resulteren in een verhoogde tolerantie voor deze herbiciden omdat de affiniteit tussen enzym en herbicide hierdoor verlaagd wordt.

Het *ahas* gen uit onderhavige aanvraag heeft een S653N mutatie ondergaan waardoor tolerantie voor het herbicide Imazamox is verkregen (13). Deze verworven resistentie is gebruikt als selectiesysteem voor de aardappeltransformaties.

3. Overwegingen en advies

3.1 Overweging van mogelijke risico's van het genetisch gemodificeerde gewas

Aardappel kan in Nederland niet uitkruisen met wilde verwanten, maar wel met andere gecultiveerde aardappelrassen (4). Echter de kans dat dit zal gebeuren is klein en hierbij dient te worden opgemerkt dat aardappels in Nederland vegetatief worden vermeerderd. Daarnaast zijn aardappelknollen koudegevoelig en kunnen alleen achtergebleven aardappelknollen tijdens zachte winters overleven en het volgende jaar uitlopen (4).

Opslagplanten kunnen ontstaan uit levensvatbare knollen dan wel uit zaden die zijn achter gebleven op het perceel of in de directe omgeving. Aardappelopslag uit knollen onderscheidt zich van opslag uit zaad. Aan opslag uit zaad zitten cotylen, terwijl die niet zitten aan opslag uit knollen. Onder omstandigheden (bijvoorbeeld bij aardappelrassen die veel zaad zetten) is het merendeel van de opslagplanten afkomstig van opslagzaad. Opslagplanten worden met name aangetroffen na een zachte winter. Echter, in het kader van de verplichte bestrijding van de aardappelziekte, zoals is vastgelegd in de "Verordening Hoofdproductschap Akkerbouw bestrijding *Phytophthora infestans* bij aardappelen 2003", wordt eventuele aardappelopslag routinematig verwijderd. Controle op uitvoering van de opslagbestrijding wordt uitgevoerd door de Plantenziektenkundige Dienst. Een onderdeel van deze *Phytophthora*-bestrijding is dat tenminste twee jaar geen aardappelteelt op hetzelfde veld mag plaatsvinden. In de praktijk blijkt dat aardappelopslag doelmatig bestreden wordt. Aardappel kan zich in Nederland niet handhaven. Verwildering, het proces waarbij zich vanuit cultuurpopulaties beklijvende wilde populaties ontwikkelen, is in Nederland dan ook niet waargenomen bij aardappel.

De COGEM merkt op dat een verlaging van het amylopectinegehalte met als resultaat een verhoging van het zetmeelgehalte invloed kan hebben op de vorsttolerantie van de aardappelplant. De aanvrager levert geen ondersteunende gegevens hierover aan wat ook niet noodzakelijk is voor een klasse twee experiment. Er worden namelijk voldoende inperkingsmaatregelen (tien meter isolatiezone en verwijderen van opslag) in acht genomen om uitkruising naar cultuurverwanten te voorkomen. Bij eventuele opschaling van de veldproef acht de COGEM het echter wel noodzakelijk dat gegevens omtrent de vorsttolerantie worden aangeleverd.

3.2 Overweging van mogelijke risico's van de ingebrachte genen

De aardappelplanten zijn genetisch gemodificeerd met behulp van het plasmide pHAS3 of het plasmide pHASHS5, die beide afgeleid zijn van de vector pPZP200. Beide vectoren bevatten fragmenten van *be* genen, die coderen voor vertakkings-enzymen en na transcriptie een 'inverted repeat' vormen. De genetisch gemodificeerde aardappelplanten bevatten tevens een gemuteerd *ahas* gen, waardoor tolerantie voor het herbicide Imazamox is verkregen (13). De COGEM merkt hierbij op dat deze herbicidenresistentie niet van agronomische betekenis is omdat de toepassing van Imazamox in Nederland verboden is.

Daarnaast zijn het antibioticumresistentiegen *aadA* en nog enkele regulatorische sequenties aanwezig op de vector 'backbone'. De aanvrager zal alvorens de genetisch gemodificeerde aardappelplanten in het veld worden gezet gegevens aanleveren waaruit blijkt dat het *aadA* gen en andere op de 'vectorbackbone' gelegen sequenties niet aanwezig zijn in de genetisch gemodificeerde aardappelplanten. De COGEM is

van mening dat aan alle criteria voor de beschrijving van de constructen zoals die vereist zijn voor een klasse twee experiment, wordt voldaan.

3.3 Advies

Het onderhavige advies heeft betrekking op een vergunningaanvraag voor veldexperimenten met genetisch gemodificeerde aardappelen met verlaagd amylopectinegehalte. De aardappelknollen zijn doorgaans vorstgevoelig en zullen de Nederlandse winter gewoonlijk niet overleven. Alleen tijdens zachte winters zijn de aardappelknollen in staat te overleven en het volgende jaar uit te lopen. Bij opschaling acht de COGEM gegevens omtrent de vorstgevoeligheid noodzakelijk. De genetisch gemodificeerde aardappel kan in Nederland niet uitkruisen naar wilde verwanten. De aardappel kan wel uitkruisen naar andere cultuurrassen, maar de kans daarop is klein. De isolatiezone van tien meter zoals in de ontwerpbeschikking wordt voorgeschreven, is voldoende om uitkruising naar cultuurverwanten te voorkomen. Eventuele opslag uit zaad of achtergebleven knollen zal worden bestreden in het kader van de verplichte bestrijding van *Phytophthora infestans*. In de praktijk blijkt dat deze aardappelopslag effectief bestreden wordt.

De vector is voor een klasse twee experiment voldoende gekarakteriseerd. Er is een kaart van het construct aangeleverd waaruit blijkt welke combinaties van tot expressie te brengen sequenties, regulatie sequenties en overige selectie elementen zijn gebruikt voor de modificatie.

Dit alles overwegende heeft de COGEM tegen de in de aanvraag beschreven werkzaamheden, onder de voorgestelde voorwaarden, geen bezwaar en acht zij de risico's van deze veldproef voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. T.B. Tutin, N.A. Burges, A.O. Chater, J.R. Edmondson, V.H. Heywood, D.M. Moore, D.H. Valentine, S.M. Walters, and D.A. Webb (1972). *Flora Europaea: Diapensiaceae to Myoporaceae*. Cambridge University Press, Cambridge
2. Van der Meijden, R (1996). *Heukels' flora van Nederland*, 22^e druk, Wolters-Noordhof, Groningen
3. Plaisted R.L. (1980). Potato. In: Fehr WR & Hadley HH (Eds). *Hybridization of crop plants*. Am. Soc. Agr. Wisconsin. USA
4. Consensus Document on the Biology of *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* (Potato) No. 8, 1997
5. Botanical Files de Vries, F.T., van der Meijden R., Brandenburg, W.A, Gorteria, supplement 1. 1992
6. Lawson H.M.(1983). True potato seeds as arable weeds. *Potato Research* 26: 237-246
7. Love S. and Pavek J. (1994). Ecological Risk of growing transgenic potatoes in the United States and Canada: potential for vegetative escape or gene introgression into indigenous species. *American Potato Journal* 71: 647-658.
8. Wesley, SV, Helliwell CA, Smith, NA, Wang, M, Rouse DT, Liu, Q, Gooding PS, Singh, SP, Abbott, D, Stoutjesdijk PA, Robinson, SP, Gleave AP, Green, AG and Waterhouse PM (2001). Construct design for efficient and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal* Vol. 27, pp. 581-590
9. Muskens, MWM, Vissers APA, Mol, JNM, Kooter JM. (2000) Role of inverted DNA repeats in transcriptional and post-transcriptional gene silencing. *Plant Molecular Biology* Vol. 43, pp. 243-260
10. Yu, H, Kumar PP. (2003). Post-transcriptional gene silencing in plants by RNA. *Plant Cell Reports* (22): 167-174
11. Wassenegger M. and Pélissier T. (1998). A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. *Plant Molecular Biology* (37): 349-362.
12. Matzke M, Matzke, AJM and Kooter JM (2001). RNA: Guiding gene silencing. *Science* (293): 1080-1083
13. Andersson, M, Trifonova, A, Andersson, A.B., Johansson, M, Bülow, L, Hofvander, P (2003). A novel selection system for potato transformation using a mutated AHAS gene. *Plant Cell Rep* (22): 261-267