



Het op de markt brengen van een gentech siergewas; virtuele casussen.

Auteur: Dr. F.A. Krens



Plant Research International, onderdeel van Wageningen UR
Wageningen UR Plant Breeding
Januari 2012

Eindrapport

© 2012 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: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Plant Research International, 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 heffing betalers van het internet worden gedownload via www.tuinbouw.nl van het Productschap Tuinbouw.



PT-projectnummer 13973

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.pri.wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
1. Samenvatting	1
2. Achtergrond	2
3. Beschrijving projectverloop	3
3.1 Voorbereidingen	3
3.2 Markttoelatingsaanvraag	4
3.3 Reacties	4
3.3.1 Het aanvraagformulier.	4
3.3.2 Reikwijdte van de aanvraag.	4
3.3.3 Aanbevolen traject.	4
3.3.4 Toxiciteit/allergeniciteit.	5
3.3.5 Equivalentie.	5
3.3.6 Precedent.	5
3.3.7 Lijst van nog benodigde analyses en toetsen.	5
3.4 Conclusies en acties	6
4. Conclusies	8
Bijlage I. PT13973 Stand van zaken, 17 maart 2011	1
<i>Conclusies en vragen n.a.v. de eerste bijeenkomst van de BCO op 10 december 2010.</i>	1
<i>Voorlopige conclusies n.a.v. de bestudering van de 'anjer-dossiers'.</i>	1
<i>Vervolg:</i>	3
Bijlage II. Summary information format for products containing genetically modified higher plants (GMHPs) (see also Council Decision 2002/812/EC)	1
a. <i>General information</i>	1
b. <i>Nature of the gmhp contained in the product information relating to the recipient or (where appropriate) parental plants</i>	3
c. <i>Information relating to previous releases</i>	11
d. <i>Information relating to the monitoring plan - identified traits, characteristics and uncertainties related to the gmo or its interaction with the environment that should be addressed in the post commercialisation monitoring plan:</i>	11
Bijlage III.1 Werkdocument aanvraag introductie in het milieu van gentech lelies met luisresistentie, veldproef categorie 1 plus markttoelatingsaspecten.	1

1. Samenvatting

Het doel van dit project was om na te gaan wat er bij komt kijken om een genetisch gemodificeerd siergewas te vermarkten. Het idee bestaat bij betrokken partijen in de wetenschap en bij het bedrijfsleven dat vermarkting voor GM siergewassen makkelijker en sneller en daarmee goedkoper zou moeten kunnen zijn dan voor GM voedsel- of veevoedergewassen. In de Europese Unie is er reeds sprake van een precedent; er zijn enkele GM anjer cultivars tot de EU markt toegelaten voor import en processing, maar niet voor teelt! Om het doel van dit project te realiseren zijn er twee virtuele casussen geformuleerd die verder zijn onderzocht. In verband met de ingewikkeldheid van de materie is in de loop van dit project besloten om het werk te concentreren op één van de casussen, namelijk degenen die het dichtst bij realisatie is en waarvan invulling en uitwerking van de casus het concreetst gemaakt kon worden. Dit betrof de casus van een genetisch gemodificeerde lelie met geïntroduceerde resistentiegenen tegen bladluizen als overbrenger van virussen.

Aan de hand van de GM anjer-dossiers is informatie verzameld en doorgesproken met het Bureau Genetisch Gemodificeerde Organismen. Vervolgens is het op de webpagina van het BGGGO aanwezige formulier voor het aanvragen van markttoelating inclusief teelt ingevuld voor de specifieke virtuele siergewas-casus. Het BGGGO was bereid deze aanvraag te bestuderen en te becommentariëren. Hieruit bleek dat er geen actueel uitgebreid aanvraagformulier voor markttoelatingen beschikbaar is op dit moment en dat het ingevulde formulier slechts een samenvattingsformulier was. Ook ontbrak de nodige concrete informatie als gevolg van het feit dat het een virtuele aanvraag betrof en daarmee bepaalde specifieke informatie niet gegeven kon worden, zoals bijvoorbeeld de moleculaire analyse van de lijn waarvoor de toelating werd gevraagd. Daarnaast bleek er veel onduidelijkheid over bepaalde typen informatie die in het commentaar gevraagd werden. De minimale eisen die aan een gewas worden gesteld bleken niet helder. Er werd verwezen naar de uitgebreide GM anjer aanvraag opgesteld door Florigene, maar er kon niet aangegeven worden wat er van de door Florigene aangeleverde informatie nu vanuit de overheid werd gevraagd en wat op eigen initiatief was aangeleverd.

De onduidelijkheden in de procedure kunnen heel goed als consequentie hebben dat een aanvraag te veel tijd in beslag zou gaan nemen en dat daardoor en door eventueel nog uit te voeren tests en toetsen de kosten die met een aanvraag voor markttoelating gemoeid zijn voor de siersector te hoog zouden oplopen. Het was duidelijk dat een virtuele aanvraag verder niet zou bijdragen aan het verkrijgen van inzicht in de (on)mogelijkheden van markttoelating voor siergewassen. Daarom is er besloten om een formele aanvraag voor introductie in het milieu veldproef categorie 1 op te stellen en in te dienen voor de GM lelies, die inmiddels daadwerkelijk zijn geproduceerd en dus niet meer virtueel zijn. Dit zal moeten gebeuren binnen een vervolgproject.

2. Achtergrond

Genetische modificatie is een techniek die grote mogelijkheden biedt om gewassen te verbeteren, maar de acceptatie door de consumenten van z.g. genteelgewassen 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 genteelgewas 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 genteelgewassen. 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, zij zijn ook voor siergewassen hoogstwaarschijnlijk niet van een dergelijke grootte, daar de meeste siergewassen niet zullen worden gegeten door mens noch dier. Belangrijk is te weten aan wat voor eisen de nieuwe genteel 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 dit project is te weten te komen wat voor eisen het Ministerie van Infrastructuur en Milieu via Bureau GGO en namens de EU stelt aan genteel siergewassen bij de z.g. "Introductie in het milieu en in de markt" t.b.v. teelt, import en handel/verwerking. Dit moet inzicht verschaffen in de orde van grootte van de aan marktintroductie verbonden kosten.

3. Beschrijving projectverloop

3.1 Voorbereidingen

Allereerst is er een concept vragenlijst opgesteld die bedoeld was om te dienen voor een inventarisatie bij het bedrijfsleven werkzaam in de sierteelt van de wensen, vragen en voorwaarden, die men in de sector heeft voor wat betreft het vermarkten van gentech siergewassen. Dit conform deel 1 van het plan van aanpak uit de projectaanvraag. De concept vragenlijst is voorgelegd aan de Begeleidingscommissie (BCO) van dit project en besproken in december 2010. De BCO bestond uit:

Dhr. A. Alders	MAK Breeding b.v. (aanvankelijk samen met dhr. M. Ceulemans)
Dhr. C. Randag	Sande Breeding b.v.
Dhr. P. Schrama	Olij Roses
Dhr. A. Vletter	Vletter & Den Haan
Dhr. J. v.d. Knaap	LTO Groeiservice (opvolger in dit project van dhr. M. Beelen)
Dhr. T. Simons	Plantum
Mw. M. Compier	Productschap Tuinbouw

Ter vergadering is besloten af te zien van de inventarisatie en het stappenplan aan te passen. De aanpassing hield in dat er direct begonnen zou worden met het bestuderen van de dossiers van de reeds in de EU toegelaten anjer cultivars, dat de voor de voorziene virtuele casussen relevante informatie daaruit geëxtraheerd zou worden en dat dit met vertegenwoordigers van het Bureau Genetisch Gemodificeerde Organismen (BGGO) doorgesproken zou worden. De virtuele casussen betroffen GM rozen gemodificeerd qua bloemkleur (ingeperkte teelt in kassen, wilde verwanten in Nederland aanwezig, puur cosmetische modificatie) en GM lelies gemodificeerd qua luizenresistentie ('open' teelt in volle grond, geen wilde verwanten in Nederland, milieuvriendelijke modificatie). Het stappenplan hield verder in

- 1) contact opnemen met BGGO
- 2) invullen van een markttoelatingsformulier
- 3) voorleggen van de aanvraag aan BGGO voor commentaar
- 4) verwerken commentaar
- 5) identificeren van obstakels
- 6) trekken van conclusies

Bestudering van de anjer-dossiers leverde de nodige vragen op. BGGO bleek op verzoek bereid om die vragen in een BCO-vergadering te komen beantwoorden en ook anderszins commentaar en advies te geven. Om belangenverstrengeling te voorkomen konden vertegenwoordigers van BGGO geen zitting nemen in het projectteam of de BCO. In januari 2011 is de stand van zaken van dat moment met de vragen uit de anjer-dossiers beschreven (bijlage I) en in maart 2011 is deze t.b.v. de geplande vergadering opgestuurd naar de BCO samen met voorbeelden van een oningevuld aanvraagformulier voor markttoelating en van het tijdschema van de toelatingsprocedure zoals die te vinden zijn op de webpagina van BGGO. In de BCO bijeenkomst van maart 2011 is een en ander besproken met mw. C. Roesink namens BGGO. Opmerkelijke punten uit de discussie bleken a) voortschrijdend inzicht kan aanleiding zijn om een afgegeven toestemming voor teelt aan te passen of terug te draaien; b) andere cultivars met dezelfde modificatie en zelfs kruisingsproducten van een toegelaten cultivar moeten weer de hele procedure doorlopen; c) om toelating te krijgen moet er eerst een categorie 3 veldproef gedaan zijn, d.w.z. in verschillende EU landen; d) de European Food Safety Authority (EFSA) geeft aan dat siergewassen niet volgens de EFSA food/feed regelgeving beoordeeld hoeven te worden maar geadviseerd wordt om toch toxiciteitsvragen voor te zijn; e) BGGO adviseert om zo veel mogelijk de aanwezigheid in het eindproduct van antibioticum resistentiegenen te vermijden. Als uitkomst van het overleg is besloten om over te gaan tot daadwerkelijke invulling

van het formulier voor markttoelating binnen de EU. De keus voor het gewas viel op lelie omdat deze als weliswaar virtuele casus het dichtst bij realisering en daarmee bij de realiteit stond en dat de teelt voor dit gewas in Nederland relevanter is dan de teelt van rozen. Rozen worden vooral elders geteeld en vervolgens geïmporteerd.

3.2 Markttoelatingsaanvraag

Op de webpagina van BGGO was één formulier aanwezig om te downloaden dat verband hield met de aanvraag voor markttoelating van genetisch gemodificeerde gewassen. Dit formulier was eerder meegestuurd met de stukken van de BCO vergadering van maart 2011 en is n.a.v. de besluiten van die vergadering gebruikt om in te vullen voor de lelie-casus waarbij een tweetal genen is ingebracht om resistentie tegen luizen te geven en daarmee virusinfecties tegen te gaan. Het ingevulde formulier is als bijlage II aan deze rapportage toegevoegd. Deze aanvraag is eind mei 2011 naar BGGO opgestuurd ter becommentariëring. Hun reactie erop is begin juli 2011 ontvangen.

3.3 Reacties

Het commentaar van BGGO op de markttoelatingsaanvraag omvatte punten van algemene aard en gedetailleerde technische vragen, specifiek voor de casus. Hieronder is het commentaar puntsgewijs samengevat en volgt een lijst met additionele informatie die nog noodzakelijk is voor dit type aanvraag. Deze informatie kan komen uit literatuuronderzoek, maar soms zijn ook aanvullende toetsen nodig.

3.3.1 Het aanvraagformulier.

Het aanvraagformulier was gedownload van de webpagina van BGGO als zijnde het document om een markttoelatingsaanvraag bij het Ministerie in te dienen. De eerste opmerking van BGGO was dat dit het formulier voor de samenvatting was. Het uitgebreide aanvraagformulier had gebruikt moeten worden. Dit laatste blijkt echter niet verkrijgbaar bij BGGO/Ministerie! Florigene heeft bij zijn aanvragen voor GM anjers er zelf één opgesteld en hier wordt nu door BGGO naar verwezen. De laatste Florigene aanvraag is een document van 238 pagina's groot! Onduidelijk is of alle door Florigene aangeleverde informatie en de vorm waarin dit is gebeurd op aanvraag is of eigen initiatief, kortom of het Ministerie zelf richtlijnen heeft of een idee over wat zij voor informatie nodig heeft. Het lijkt nu overgelaten aan de aanvrager en het lijkt alsof Florigene de standaard heeft gesteld met zijn dossiers.

3.3.2 Reikwijdte van de aanvraag.

Het was eerder al duidelijk gemaakt dat er voor elke cultivar met dezelfde eigenschappen, die door GM geïntroduceerd zijn, een aparte aanvraag ingediend zou moeten worden. Nu werd aangegeven dat dit ook zou gelden voor kruisingsproducten die verkregen waren met een reeds eerder aangemelde en goedgekeurde GM lelie en wordt daarbovenop aangegeven dat ook voor varianten van specifieke GM lелиeproducten, dus de snijbloemvariant naast de potvariant, aparte aanvragen ingediend moeten worden omdat de risicoanalyse voor verspreiding mogelijk anders kan uitvallen. De vraag is welke van de nader te omschrijven toetsen voor elke variant of ras of sectievertegenwoordiger opnieuw zullen moeten worden uitgevoerd. De afhandeling door BGGO, COGEM, Ministerie, EU zal voor elke aanvraag zijn eigen pad en tijdsduur en daarmee kosten kennen.

3.3.3 Aanbevolen traject.

Voor toelatingen voor teelt en markt is een bepaald traject verplicht; dit traject omvat eerst categorie 1 veldproeven, categorie 2, categorie 3 en dan de eigenlijke markttoelatingsaanvraag inclusief teelt. Even aannemende dat voor elke categorie één jaar nodig is, dan betekent dit dat na het maken van de GM lelie en testen en karakteriseren in de kas het nog drie jaar duurt voordat de markttoelatingsaanvraag kan worden ingediend. Met een tijdspad van 2,5 jaar betekent dit 5,5 jaar tussen klaar zijn en de markt op kunnen. De aanname van 2,5 jaar is gebaseerd op de tijd die bij de Florigene aanvragen zit tussen indienen en het positieve besluit van de EU. Deze aanvragen betreffen uitsluitend import en géén teelt. Onbekend is of dat laatste een langer tijdspad met zich meebrengt.

3.3.4 Toxiciteit/allergeniciteit.

Informatie over toxiciteit van de geïntroduceerde genproducten moet aangeleverd, ook in siergewassen. Vraag is in hoeverre dit moet worden getoetst of uit literatuur mag worden afgeleid. EFSA stelt dat voor siergewassen uitgebreide toxiciteitstoetsen niet nodig zijn, maar gaat toch in op de door Florigene aangeleverde resultaten van toxiciteitstoetsen. Aantal en type van zulke toetsen variëren in de diverse Florigene aanvragen en onbekend is of hier gewoon door de overheid minimale eisen zijn geformuleerd of dat het wederom aan de aanvrager wordt overgelaten. Binnen de sector Siergewassen bestaat de perceptie dat aangezien het siergewassen betreft er dus zijn heel wat minder allergeniciteits- en toxiciteitsaspecten aan de orde zullen zijn bij een aanvraag. Dit lijkt tegen te vallen. Wat voor welomschreven toetsen worden er voor siergewassen, in dit geval lelies met insectenresistentie, gevraagd?

3.3.5 Equivalentie.

Florigene meldt speciale vergelijkingstoetsen op habitus en groei gedaan te hebben tussen de GM anjer en de ontvangende cultivar. Die zijn beschreven in een aparte bijlage. In die bijlage wordt de proefopzet beschreven en worden de resultaten van metingen aan 18 morfologische kenmerken en de statistische significantie van de waargenomen verschillen plus de bloeitijden van de beide lijnen in twee tabellen weergegeven. Florigene zelf geeft aan dat de gevonden verschillen niet bijdragen aan een verhoogde overlevingskans. Onduidelijk is waar die uitspraak op gebaseerd is, maar hij wordt overgenomen. Ook is niet duidelijk of deze informatie gevraagd wordt en nodig is of niet.

3.3.6 Precedent.

Voor een aantal aspecten verwijst Florigene naar langjarige ervaringen opgedaan met teelt, productie, transport etc. in het buitenland. Hiervoor is dus geen precedent aanwezig voor de situatie van teelt en vermarkting in de EU en in het bijzonder in Nederland. Ook hier is onduidelijk wat de eisen zijn waaraan een siergewassenproduct bij teelt e.d. moet voldoen.

3.3.7 Lijst van nog benodigde analyses en toetsen.

Zeker:

- 1) Inventarisatie tuintypes lelie, kruisbaar met een Oriental.
- 2) Lijst insecten die op lelie vliegen in Europa.
- 3) Beschrijving van Good Agricultural Practice in lelie met nadruk op voorkomen mogelijke ongewenste verspreiding.
- 4) Moleculaire gegevens over opbouw en sequentie van de gebruikte vector.
- 5) Moleculaire gegevens over de sequenties van T-DNA insertie en de flankerende regio's.
- 6) Werkingsmechanismen algemeen van de geïntroduceerde genen/genproducten.

- 7) Kastoetsen insectenresistentie.
- 8) Effecten van de GM lelie op reproductie, disseminatie en overleving (theoretisch en later, specifiek voor de GM lijn).
- 9) Ames toxiciteitstest.
- 10) Sla zaad test .
- 11) Databases doorzoeken met de aminozuurvolgorde van de geïntroduceerde genen op toxiciteit en allergeniciteit.
- 12) Databases doorzoeken met de aminozuurvolgorde van eventueel nieuw gevormde ORFs.
- 13) Monitoringplan.
- 14) Segregatie/uitkruisingstoetsen.
- 15) Vergelijkingstoetsen fenotype.

Mogelijk:

- 1) Contactallergie: literatuur; toetsen op mensen, non-target studie.
- 2) Voedseltesten met pollen en blad op diverse insecten.
- 3) Verspreidingstoetsen.
- 4) Vergelijkingstoetsen overleving bollen.
- 5) Impacttoetsen.

3.4 Conclusies en acties

De belangrijkste conclusies die uit het commentaar van BGGO op de virtuele markttoelatingsaanvraag getrokken kunnen worden zijn:

- 1) Er is geen actueel vragenformulier voor een uitgebreide, formele aanvraag. Onduidelijk is ook welk type informatie en tot in welk detail aangeleverd moet worden. Het Florigene dossier geeft informatie over aspecten die in het geval van lelie niet relevant zijn en geeft geen informatie over bepaalde aspecten die voor lelie juist weer wel relevant zijn. Het kan dus niet voor 100% als voorbeeld dienen. Kortom, veel onduidelijkheid, geen specifieke richtlijnen.
- 2) Diverse analyses en toetsen moeten uitgevoerd worden alvorens markttoelating en teelt aan de orde kunnen zijn. Een deel van deze analyses kan onderdeel zijn van de veldproeven categorie 1, 2 en 3 die aan een markttoelating zullen moeten voorafgaan.
- 3) Het tijdsplan tussen een GM lelie klaar hebben en ermee de markt op kunnen zal ongeveer 5,5 jaar lang zijn. Dit is exclusief het maken (de transformaties zelf) en het karakteriseren, moleculair en fenotypisch, inclusief resistentietoetsen in de kas. Het produceren van voldoende plantmateriaal om de markt te kunnen bedienen (vermeerderen) kan waarschijnlijk parallel lopen aan de aanvraag en zal niet ook nog extra tijd vragen. Voor een siergewas kan het totale tijdsplan zoals dat geschetst is, te lang zijn.
- 4) De kosten die met het maken van een GM siergewas gemoeid zijn en die met de toelating gemoeid lijken te zijn vanwege de looptijd en de toch nog (waarschijnlijk) benodigde toetsen zullen voor een siergewas al snel te hoog uitvallen. Geschat wordt dat die minimaal € 150.000 zullen bedragen.

Het commentaar en de conclusies zijn begin september 2011 doorgesproken met de BCO. Het doortrekken van conclusie 4 naar een algemene conclusie als "Teelt en vermarkting van gentech siergewassen zijn in Nederland en Europa geen optie" vond de BCO vooralsnog te ver gaan, vooral gezien de onduidelijkheden over minimale

eisen en richtlijnen. Men wilde ernaar streven om iets concreets op papier te krijgen wat de onmogelijkheden zichtbaar zou maken. Er was behoefte aan uitspraken over deze materie door de Ministeries van I&M en ELI, zo nodig via een politiek document. Besloten is om de geconstateerde onduidelijkheden in een werkdocument (bijlage III) samen te vatten en dit document aan BGGO voor te leggen om te proberen van hen meer duidelijkheid te verkrijgen over de minimale eisen waaraan een aanvraag voor markttoelating van een gentech siergewas moet voldoen. Hetzelfde document is ook ter beschikking gesteld aan de NIABA zodat zij het konden gebruiken bij het opstellen van een reactie op het Ontwerpbesluit Genetisch Gemodificeerde Organismen Milieubeheer 2012 zoals dat op 26 oktober 2011 door het Ministerie van I&M in de Staatscourant is gepubliceerd.

BGGO stelde in hun reactie op het werkdocument voor om het virtuele traject te verlaten en over te gaan tot het indienen van een concrete aanvraag voor een veldproef categorie 1. Aangezien van de virtuele dossiers, roos/kleur en lelie/insectenresistentie, de laatste het dichtst bij realisering is, heeft de BCO besloten een vervolprojectaanvraag bij het Productschap Tuinbouw in te dienen gericht op het invullen van de aanvraagformulieren voor introductie in het milieu via een veldproef categorie 1 voor lelie als voorbeeld voor een siergewas. BGGO heeft aangeboden om een dergelijke aanvraag in de conceptfase reeds te willen bespreken en dan uitleg te geven over nu nog onduidelijke punten en te bediscussiëren wat er aan informatie nog nodig is en waarom. Ook werd aangegeven dat het mogelijk is om een heleboel informatie tijdens het uitvoeren van de veldproeven te verzamelen. Hiermee moet het mogelijk worden om op termijn de door de BCO gewenste duidelijkheid en inzicht in (on)mogelijkheden van gentech in siergewassen te verkrijgen.

4. Conclusies

- De aanname dat GM siergewassen makkelijker en sneller op de markt in de Europese Unie zullen worden toegelaten dan voedsel- of veevoedergewassen, wordt niet ondersteund door de bevindingen in dit project.
- Het Ministerie van Infrastructuur en Milieu heeft geen duidelijke minimale eisen en richtlijnen geformuleerd en beschikbaar voor de aanvraag van teelt en markttoelating in de EU voor een GM siergewas. Er is geen format voor een aanvraagformulier.
- Obstakels voor implementatie van genetische modificatie in siergewassen in markttoelating zijn de lengte van de aanvraagprocedure (geschat op 2,5 jaar), de minimale kosten i.v.m. het verkrijgen van de benodigde informatie (voor zover bekend wat die moet zijn, geschat op minimaal € 150.000) en het feit dat voor elke cultivar met dezelfde modificatie, groeitype binnen dezelfde cultivar en voor kruisingsproducten van een GM cultivar een aparte procedure nodig (b)lijkt.
- Om zicht te krijgen op wat er precies nodig is aan informatie en wat de (on)mogelijkheden concreet zijn is een daadwerkelijke aanvraag voor introductie in het milieu, veldproef categorie 1 nodig. Het gehele traject van veldproeven categorieën 1, 2 en 3 tot en met de aanvraag voor markttoelating inclusief teelt zal doorlopen moeten worden voor het totaalbeeld. Dit totaalbeeld zal moeten gelden voor elk GM siergewas.

Bijlage I.

PT13973 Stand van zaken, 17 maart 2011

Conclusies en vragen n.a.v. de eerste bijeenkomst van de BCO op 10 december 2010.

- Consumentaspecten worden vooralsnog buiten beschouwing gelaten.
- Een enquête is niet nodig.
- Beginnen met het extraheren van zoveel mogelijk relevante informatie uit de dossiers van in de EU toegelaten anjers.
- Het vervolg zal plaatsvinden in nauwe samenwerking met BGGO; iemand van BGGO zal uitgenodigd worden deel uit te maken van de BCO.
- Mogelijk kan i.v.m. de hoeveelheid werk slechts één casus uitgewerkt worden; de BCO houdt een voorkeur voor 2 casussen.
- Volgende bijeenkomst, vrijdag 25 maart 2011, 9:30 uur te PT, Zoetermeer mét iemand van BGGO.
- Vragen:
 - Welke informatie is nodig?
 - Wat is het tijdspad, hoe lang duurt het van aanvraag tot markttoelating?
 - Wat zijn de kosten?
 - Is een toestemming gewas-breed of ras-specifiek of casus-specifiek? Is er nut voor het opstellen van z.g. white papers voor individuele gewassen, waarin al standaard een hoop taxonomische, bloembioologische en ecologische gegevens zijn verzameld?

Voorlopige conclusies n.a.v. de bestudering van de 'anjer-dossiers'.

Cursief staan vragen die mogelijk of door de BCO of door de vertegenwoordiger van BGGO beantwoord kunnen worden.

- 1) Allereerst moet voor het uitwerken van casussen duidelijk worden of toelating wordt gevraagd voor *teelt in de EU (NL) of slechts voor import en verhandeling*. Dit kan duidelijke consequenties hebben voor de aan te leveren informatie.
- 2) Voor een aanvraag voor markttoelating is een formulier beschikbaar op de website van BGGO. Hierop is te vinden wat voor informatie er gevraagd wordt. Dit formulier zal meegestuurd worden aan de leden van de BCO (bijlage 1). Het betreft o.a. informatie voor de ontvangende plant/soort/cultivar over vermeerdering, verspreiding, uitkruising, overlevingsstructuren, geografische verspreiding, interacties met andere organismen, bekende toxiciteit of allergeniciteit. Daarnaast wordt informatie gevraagd over de specifieke genetische modificatie en over een z.g. environmental risk assessment (ERA) van de GGP. Hierin wordt gevraagd naar mogelijke selectieve voordelen van de GGP voor overleving in de omgeving, voor mogelijk toegenomen onkruid eigenschappen of persistentie, de effecten op doel- en niet-doelorganismen, de effecten op het bodem ecosysteem en naar mogelijke toxiciteit of allergeniciteit van de geïntroduceerde eiwitten. De GGP moet onderscheidbaar en detecteerbaar zijn en er moet een monitoringsplan worden opgesteld.
- 3) Het tijdspad is formeel vastgelegd (zie bijlage 2) en bedraagt volgens dat document minimaal 225 dagen. Als er aanvullende informatie wordt gevraagd, wordt de klok stilgezet en weer opgestart na het ontvangen van die informatie. Ook zit er nog een onzekerheidsfactor qua tijd als de Europese Commissie geen

overeenstemming weet te bereiken en er een stemronde moet volgen. Als men de verschillende dossiers bekijkt, valt op dat het meestal ongeveer 2,5 jaar duurt van indiening aanvraag tot beschikking. Bijvoorbeeld de aanvraag C/NL/06/01 voor de anjer Moonaqua™ is door de NL competente autoriteiten ontvangen op 13 oktober 2006, klok stilgezet van 31 oktober 2006 tot 26 december 2006 voor aanvullende informatie, COGEM advies is uitgebracht op 6 februari 2007, het 'assessment report' op 27 februari 2007, het EFSA rapport op 12 maart 2008 en het besluit van de EC op 16 maart 2009.

- 4) NL kent een stap-voor-stap principe wat inhoudt dat formeel er eerst vergunning moet worden aangevraagd voor Categorie 1 veldwerkzaamheden, dan voor een Categorie 2 en tot slot voor een Categorie 3. *De vraag is of dit altijd nodig is en of daarna pas een markttoelating aangevraagd kan worden.* Het kan uiteraard zijn dat de veldproeven de informatie moeten opleveren die nodig is voor een markttoelatingsaanvraag. Aangezien er voor de Categorie Veldwerkzaamheden al een ERA opgesteld zal moeten worden, kan het zijn dat die al (deels) voldoende is voor de markttoelating en dat kan tijd schelen. *Een vraag is hoe het zit in geval van kasteelt?* Interessant in dit verband is dat voor de anjer Moonshadow™ oorspronkelijk toestemming was gevraagd en verkregen voor teelt in Europa (daadwerkelijk plaatsgevonden van dec. '98 tot juli '99 in Spanje), maar dat bij de 10-jaarlijkse revisie/verlenging van de vergunning nadrukkelijk is gesteld dat dat alleen nog maar om import zou gaan. *Vraag: wat maakt dit voor verschil in dit geval? Wat waren de beweegredenen? Wat waren de voorwaarden destijds (heb ik niet terug kunnen vinden)?*
- 5) De aanvragen zijn tot nu toe casus-specifiek, maar veel van de informatie bijvoorbeeld die over het ontvangende gewas kan bij elke aanvraag gebruikt worden en hoeft niet opnieuw gegenereerd te worden.
- 6) Bij de 'anjer-dossiers' handelt het om bloemkleur als eigenschap met additioneel een herbicide-resistentie t.b.v. selectie in vitro; wel in alle gevallen om genen afkomstig van planten. Antibioticum-resistentie genen zijn buiten de EU wel toegelaten, hygromycine resistentie bijv. in katoen en soms ook in de EU, kanamycine resistentie in mais (MON863) en aardappel. De laatste is dus door de EFSA beoordeeld als veilig. Het kan een verstandige strategie zijn om indien mogelijk alleen de voor de eigenschappen gewenste nieuwe genen in te brengen, maar absoluut noodzakelijk is dat niet.
- 7) De toegelaten siergewassen zullen gelabeld moeten worden. *De vraag is dan of dit per partij, doos, bos of bloem moet.*
- 8) Het EFSA rapport over Moonaqua™ meldt t.a.v. toxicologisch onderzoek (paragraaf 4.2.4.) het volgende: "Given that carnation is not intended for human or animal consumption as food or feed but for ornamental use only, the GMO Panel does not consider it necessary to perform a comprehensive food/feed safety assessment of the whole GM plant". Toch gaan de paragrafen 4.2.5. en 4.2.6. vervolgens toch in op toxiciteit en allergeniciteit. Bij de aanvraag voor Moonshadow™ zijn een "Ames/Salmonella" mutageniciteitstoets, een "acute toxicity test in mice" en een fytoxiciteitstoets met slazaad gedaan. Voor Moonaqua™ alleen de eerste twee en voor de meest recente aanvraag C/NL/09/02 nog alleen de eerste. *Vraag: Moet het nu wel of niet en wat precies zou dan moeten?*

Vervolg:

- Frans Krens en Carolien Roesink of Boet Glandorf (BGGO) nemen de SNIFs van Moonaqua™ en IFD-26407-2 (C/NL/09/02) door op vragen van Frans en suggesties van BGGO na het in kaart brengen van de wensen van de BCO.
- Frans vult een aanvraagformulier in (*voor veldproef categorie 1, 2, 3 of markttoelating?*) voor in ieder geval één casus, n.l. lelie met insectenresistentie. Indien tijd en budget het toelaten kan een tweede casus, roos, bloemkleur, uitgewerkt.
- Frans en BGGO bediscussiëren de aanvraag en bepalen hoe verder te gaan (*is voorleggen aan de COGEM mogelijk?*)
- Frans en BGGO identificeren tijd en geld kostende obstakels voor teelt van GM siergewassen in NL/EU.
- Frans stelt eindrapport op.
- Ooit: opstellen van z.g. 'white papers' per gewas.

Dr. F.A. Krens

Bijlage II.

SUMMARY INFORMATION FORMAT FOR PRODUCTS CONTAINING GENETICALLY MODIFIED HIGHER PLANTS (GMHPs) (see also Council Decision 2002/812/EC)

A. GENERAL INFORMATION

1. Details of notification

- (a) Member State of notification: The Netherlands
- (b) Notification number:
- (c) Name of the product (commercial and other names): WUR-PB-MB-WE001
- (d) Date of acknowledgement of notification:

2. Notifier

- (a) Name of notifier: Wageningen UR Plant Breeding
- (b) Address of notifier: Droevendaalsesteeg 1, 6708 PB Wageningen, The Netherlands
- (c) Is the notifier: domestic manufacturer Yes importer No
- (d) In the case of an import the name and address of the manufacturer shall be given:

3. General description of the product

- (a) Name of the recipient or parental plant and the intended function of the genetic modification:
Recipient plant is *Lilium* Oriental hybrid cultivar 'White Express'. Oriental hybrids originate from intercrosses between at least six species of the Archelirion section of the genus *Lilium*, *L. alexandrae*, *L. auratum*, *L. nobilissimum*, *L. rubellum*, *L. speciosum* and *L. japonicum*. The intended function of the genetic modification was to introduce resistance against aphids.
- (b) Any specific form in which the product must not be placed on the market (seeds, cut-flowers, vegetative parts, etc.) as a proposed condition of the authorisation applied for: None
- (c) Intended use of the product and types of users: The ornamental product is to be used as any other lily breeding product, i.e. 1) as crossing parent in breeding programmes to develop new, derived cultivars; 2) for multiplication of bulbs in the field; 3) for induction and production of flower stems in greenhouses; 4) for auctioning and sales by wholesalers, retailers and florists.
- (d) Any specific instructions and/or recommendations for use, storage and handling, including mandatory restrictions proposed as a condition of the authorisation applied for: No specific requirements.
- (e) If applicable, geographical areas within the EU to which the product is intended to be confined under the terms of the authorisation applied for: None
- (f) Any type of environment to which the product is unsuited: None
- (g) Any proposed packaging requirements: No specific packaging will be used for transport or marketing of bulbs or flowers. All material will be handled according to general practice in handling lily bulbs and flowers.
- (h) Any proposed labelling requirements in addition to those required by law: Product information, including written advice and associated labeling will be provided with the lily bulbs and flowers. Proposed wording is: "This product is a

genetically modified lily aimed to benefit the environment and is not intended for human or animal consumption".

- (i) Estimated potential demand: Consumer market demand is driven by consumer liking and preferences, which can be subject to change within a relatively short time-frame. The product has the same appearance as the original cultivar and is expected to be appreciated similarly and for a similar period of time (4-5 years).

In 2010 301×10^6 flower stems passed through Dutch auctions of cut-lily cultivars. Approximately half of these were Oriental hybrid cultivars; some 200 Oriental hybrid cultivars are available on the market. This would mean that the potential demand for the GM lily product could range between 750.000 and 2.000.000 flower stems.

- (j) Unique identification code(s) of the GMO(s): WUR-PB-MB-WE001

4. *Has the GMHP referred to in this product been notified under Part B of Directive 2001/18/EC and/or Directive 90/220/EEC?*

Yes ? No ?

(i) If no, refer to risk analysis data on the basis of the elements of Part B of Directive 2001/18/EC:

(even als toelichting: deze virtuele casus is gericht op markttoelating en is als zodanig nog niet eerder aangemeld en dus ook nog niet bekeken door BGGO of een andere instantie. Ik kan me voorstellen dat als deze casus echt zou plaatsvinden, wat niet geheel ondenkbeeldig is, het in ieder geval eerst via veldproeven categorie 1, 2 en mogelijk 3 zal moeten gaan?! In dat geval komt hier wat anders te staan dus.)

5. *Is the product being simultaneously notified to another Member State ?*

Yes ? No ?

(i) If no, refer to risk analysis data on the basis of the elements of Part B of Directive 2001/18/EC:

Or

Has the product been notified in a third country either previously or simultaneously?

Yes ? No ?

If yes, please specify:

6. *Has the same GMHP been previously notified for marketing in the Community?*

Yes ? No ?

If yes, give notification number and Member State:

7. *Measures to take in case of unintended release or misuse as well as measures for disposal and treatment*

None

**B. NATURE OF THE GMHP CONTAINED IN THE PRODUCT
INFORMATION RELATING TO THE RECIPIENT OR (WHERE
APPROPRIATE) PARENTAL PLANTS**

8. Complete name

- (a) Family name: Liliaceae
- (b) Genus: *Lilium*
- (c) Species: Oriental hybrid; Oriental hybrids originate from intercrosses between at least six species of the Archelirion section of the genus *Lilium*, *L. alexandrae*, *L. auratum*, *L. nobilissimum*, *L. rubellum*, *L. speciosum* and *L. japonicum*
- (d) Subspecies:
- (e) Cultivar/breeding line: White Express
- (f) Common name: lily

9. (a) Information concerning reproduction

- (i) Mode(s) of reproduction:
The cultivated Oriental hybrid lily is vegetatively propagated through bulbs. Bulb propagation can be achieved in the field in the soil by bulb division but mostly bulb scaling is used. For this, scales are broken off cleanly at the basal plate. Scales can be planted directly in the soil to form new bulblets or they are incubated under the appropriate conditions in trays with peat and vermiculite for 12 to 14 weeks until bulblets are formed. A subsequent cold treatment for 12 to 14 weeks is required to break dormancy. Also in vitro multiplication using tissue culture is widely applied in lily.
Propagation by seed is possible but because lilies are self-sterile cross-pollination is a prerequisite. The genus *Lilium* consists of seven sections and the species within one section are more or less capable of hybridizing, however between sections this is not possible without the use of artificial tools such as cut-style pollination or embryo rescue. Formed hybrids can be (partly) sterile and polyploidization by colchicine/oryzaline treatment is required in order to restore fertilization. Lilies produce a lot of pollen when flowering, however, the production fields are primarily used for bulb propagation and production without flowering. Occasionally, a small portion of the bulbs is not harvested and plants are allowed to flower in the field in order to determine true-to-typeness of the cultivar. The length of the juvenile phase in lily is 2 to 3 years. Cut flower production is mostly done in specialized forcing greenhouses. Flowers are harvested in closed buds, so well before flower opening and pollen formation or pollen shed. In the end, vegetative propagation by scaling is the most cost-efficient and rapid method to increase a clone, hence it is most commonly used.
- (ii) Specific factors affecting reproduction, if any: None
- (iii) Generation time: 2 to 3 years

9. (b) Sexual compatibility with other cultivated or wild plant species

Hybridization occurs readily among the different species within the sections. Cultivated Oriental hybrids are the result of such hybridizations within the section Archelirion. The species supposed to contribute to the present day Oriental hybrid cultivars are indigenous to Asia, i.e. mainly Japan and much less China, Korea and India. Oriental hybrids are likely to be sexually compatible to each other but not to other cultivated sections, such as the Asiatic or Longiflorum hybrids. From the 100 species constituting the genus *Lilium* only about 12 species grow in Europe, more specifically in the Pyrenees, Cote d'Azur and the Balkan. Those species belong to the section Liriotypus and are not sexually compatible to the oriental hybrids.

10. *Survivability*

- (a) Ability to form structures for survival or dormancy: Products in lily are bulbs and flowers. The bulbs are to be considered as structures for survival or dormancy. Flowers, when opened in vases on display, will produce pollen. In nature pollen are spread by insects. Discarded lily flowers will have no vegetative propagation ability. Seeds will not be formed on flowers after being cut and marketed and brought indoors for display. Seeds can be produced on flowers from bulbs left in the field for verification of true-to-typeness. Some varieties are grown as potted plants; here too, seeds could be formed.
- (b) Specific factors affecting survivability, if any: None

11. *Dissemination*

- (a) Ways and extent of dissemination: Genetic material from cultivated lily can be disseminated by bulbs, pollen or seeds. Bulbs could be left in the field either intentionally or by accident by inefficient harvesting, bulbs could be dispersed during transport if not packaged properly (falling from crates). Still, large-scale lily bulb production in The Netherlands on more than 3500 hectares for more than 40 years did not lead to massive dissemination or mixing or unintended hybridization of the many cultivars grown. Moreover, most Oriental hybrids are not winter-proof. In conclusion, dissemination by bulbs is low. Pollen are not produced in production areas except by the batches of bulbs left in the field and allowed to form flowers. This pollen could be dispersed by insects and give rise to cross-pollinations with other batches of left-overs from the same section, in this case Archelirion. This will be at very low frequency. Pollen from flowers on display after sales will not be spread by lack of appropriate pollinators and recipient flowers, nor will there be time or possibility to form seeds. Seeds can only be produced from the scarce pollinations between left-overs of similar Archelirion species in bulb production fields after testing true-to-typeness, in specific greenhouses or occasionally on potted varieties. However, it is considered next to impossible to ripen late-developing lily pods outdoors, because of adverse conditions in fall and early winter. Germination requires special conditions in seedbeds outdoors; spontaneous germination in the wild hardly occurs. In summary, dissemination by seeds is very low.
- (b) Specific factors affecting dissemination, if any: None

12. *Geographical distribution of the plant:*

Lily Oriental hybrid cultivars are cultivated plants and are not found in the wild. The main production areas are in China, Chile, the USA, Japan, New Zealand and Israel and in Europe in France and The Netherlands. In The Netherlands approximately 72% of the total global bulb production takes place. Wild related species in Europe are members of another sexually incompatible section of the genus *Lilium*, i.e. the section Liriotypus. Those can be found in the Pyrenees, Cote d'Azur and the Balkan.

13. *In the case of plant species not normally grown in the Member State(s), description of the natural habitat of the plant, including information on natural predators, parasites, competitors and symbionts:*

Lily Oriental hybrids are cultivated and have no natural habitat, nor any naturally associated organisms.

14. *Potentially significant interactions of the plant with other organisms in the ecosystem where it is usually grown, including information on toxic effects on humans, animals and other organisms:*

In the production areas Oriental hybrid lilies can be under attack by insects, such as the scarlet lily beetle (*Liriocercis lillii*) and several aphids, such as the green peach aphid (*Mysus persicae*) and the cotton aphid (*Aphis gossypii*), by fungi, such as *Fusarium oxysporum* var. *lillii*, *Cylindrocarpon* and *Botrytis* blight, *B. elliptica* and *B. cinerea*, by nematodes, e.g., *Pratylenchus penetrans* and by viruses transferred by nematodes or by aphids, such as LSV (lily symptomless virus), LMoV (lily mottle virus) and CMV (cucumber mosaic virus). The list of pests and diseases mentioned here is not complete.

All members of the genus *Lilium* contain toxic compounds in all of their parts. Bulbs of most *Lilium* species taste very bitter. Ingestion of any part including the flower, especially by cats, can cause kidney failure and should be avoided. Because of this well-known fact lily flowers are generally not eaten, except for the dried bulbs or flower buds from 4 to 5 species in China. They are also scarcely used for esthetic display on food dishes by caterers etc. Despite their toxicity, lilies have been used safely by humans for ornamental purposes for centuries. Whether or not the genes introduced by genetic modification lead to gene products that are toxic seems irrelevant due to the already toxic nature of the starting material and the history of safe use of the toxic non-GM lilies up till now. The GM lilies will be treated and handled in the same, safe manner.

15. *Phenotypic and genetic traits:*

Oriental hybrid lilies are not weeds. They are late-flowering plants with broad alternate leaves. The flowers are usually large and showy and most have a powerful, sweet fragrance. They generally face upwards. The color range in Oriental flowers goes from white to all kinds of shades of pink to dark red. Some have yellow stripes in the centre of the petals. The flower stems should be firm and vigorous. Other traits, that are bred for, are resistance to fungi, such as *Fusarium* and *Botrytis* and tolerance to viruses. Because the most devastating viruses are transmitted by aphids insect resistance is also an important trait. Insufficient levels of resistance against viruses or aphids are present within the present-day cultivars and, therefore, bulbs to be planted are treated and production fields are sprayed with insecticides. In 2004 in The Netherlands e.g., 130 kg of active ingredient was used per hectare consisting for more than 65% of mineral oil together with pyrethroids. Both government and growers want to reduce the usage of agrochemicals in lily production and therefore, resistant cultivars (to either viruses or insects) are needed and desired. Genetic modification can be a method to achieve this.

INFORMATION RELATING TO THE GENETIC MODIFICATION

16. *Description of the methods used for the genetic modification:*

Genetic material (DNA, genes) was inserted into lily by transformation using a disarmed strain of *Agrobacterium tumefaciens*, JS106, which is strain AGL1 with an extra copy of virG, carrying the marker-free vector pMF2, developed by Wageningen UR Plant Breeding, equipped with two genes-of-interest aimed at introducing aphid resistance (pJS106).

17. *Nature and source of the vector used:*

The marker-free vector, pJS106, was developed by Wageningen UR Plant Breeding, The Netherlands. Starting vector was pMF1 into which a hygromycin resistance gene (*hpt*) was cloned in a unique SpeI site between the recombination sites in order to allow selection on hygromycin and marker gene removal after use, giving rise to pMF2. pMF 1 is described in Schaart et al. 2010. Transformation methods for obtaining marker-free genetically modified plants. In: Plant Transformation Technologies. CN Stewart, A Touraev, V Citovsky & T Tzfira (eds.), Wiley-Blackwell, Oxford, pp 229-242.

18. *Size, source [name of donor organism(s)] and intended function of each constituent fragment of the region intended for insertion:*

The T-DNA of pJS106 consists of two parts; one contains elements for selection and marker removal, the other part contains the genes-of-interest. In the final product described here all non-desired gene sequences related to selection and removal have been removed and are no longer present. This has been molecularly checked and verified. Here, all elements that are left behind as insertion in the lily genome will be summarized.

Element	Size	Source	Function
LB	24 bp	Ti plasmid of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , octopine strain	Defines junction between T-DNA and plant genomic DNA or vector DNA. Includes site of T-DNA processing and inside and outside border regions. Utilized in transfer of insert to the plant cell and integration into the genome
Rs recombination site	80 bp	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Defines the specific recognition site of the recombinase enzyme. Two Rs in direct orientation on one contiguous stretch of DNA will give rise to excision of the DNA sequences between the two by recombinase activity.
35S promoter	743 bp	Cauliflower Mosaic Virus (CaMV)	Constitutive promoter in plants
Cp target	301 bp	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Defines a targeting sequence derived from the small subunit rubisco gene in order to deliver the protein or enzyme as gene product into the chloroplast
Linalool synthase + intron	1648 bp; 89 bp intron inside	<i>Fragaria x ananassa</i> ; intron from <i>Fragaria vesca</i>	Defines a monoterpene biosynthesis gene converting precursor geraniol into linalool; the intron prevents leaky expression in <i>E.coli</i> and <i>A.tum.</i>
tChrRbcS	886 bp	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Defines the terminator sequence derived from the small subunit rubisco gene
pChrRbcS	1000 bp	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Defines the promoter sequence derived from the small subunit rubisco gene
Equistatin	718 bp	<i>Actinia equina</i>	Defines a gene coding for an inhibitor of cysteine and aspartic proteases effective especially in insect digestive tracts
tChrRbcS	886 bp	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Defines the terminator sequence derived from the small subunit rubisco gene
RB	24 bp	Ti plasmid of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , octopine strain	Defines junction between T-DNA and plant genomic DNA or vector DNA. Includes site of T-DNA processing and inside and outside border regions. Utilized in transfer of insert to the plant cell and integration into the genome

INFORMATION RELATING TO THE GMHP

19. *Description of the trait(s) and characteristics which have been introduced or modified:*

The genes that have been introduced in lily Oriental hybrid cv. 'White Express' are aimed at conferring resistance to insects, more specifically to aphids. The

approach is dual in that one gene (coding for linalool synthase) leads to the emission of a volatile repellent that has a function in discouraging the aphids to land on the lily plants in order to reduce the probing. Aphids probe plant leaves to locate the best places to start feeding from the phloem. For this they insert their mouth parts, called stylets, rather frequently in plant parts. In this way, by spilling some saliva, they spread viruses that are present in their saliva. Viral infections represent the real problem. The other gene codes for a proteinase inhibitor efficient in the digestive tracts of insects to prevent protein breakdown (catabolism) in their guts. After ingestion, in case they will still land and probe, their growth is greatly impaired and fecundity is reduced. Together, the gene products will lead to a significant reduction in establishment of an aphid population in lily production fields, eventually abolishing viral contaminations. This might take several years. The aphids will still have many refuges on other (wild) target plant species. Less chemicals will have to be used in controlling the diseases in lily cultivation. The environment and growers will benefit.

20. Information on the sequences actually inserted/deleted/modified

- (a) Size and structure of the insert and methods used for its characterisation, including information on any parts of the vector introduced in the GMHP or any carrier or foreign DNA remaining in the GMHP:
The GMHP contains one insert copy of the T-DNA containing only the genes-of-interest, one *R_s* recombination site and the remnants of the T-DNA border sequences. The size of the T-DNA is 6511 bp. The size and structure of the T-DNA was confirmed by Southern, PCR and iPCR molecular analysis, as well as the absence of vector backbone sequences and sequences related to selection and the marker removal system. The one copy behaves genetically as one locus.
- (b) In case of deletion, size and function of the deleted region(s): Not applicable
- (c) Location of the insert in the plant cells (integrated in the chromosome, chloroplast, mitochondrion, or maintained in a non-integrated form), and methods for its determination:
The insert has integrated in one of the lily chromosomes as determined by T-DNA locus cloning and sequencing and by the Mendelian segregation after crossing.
- (d) Copy number and genetic stability of the insert:
The insert is present in one copy with only one copy of each element as was established by Southern blotting and iPCR, followed by sequencing. The insert proved to be genetically stable after crossing.
- (e) In case of modifications other than insertion or deletion, describe function of the modified genetic material before and after the modification as well as direct changes in expression of genes as a result of the modification: Not applicable.

21. Information on the expression of the insert

- (a) Information on the expression of the insert and methods used for its characterisation:
Expression of the introduced genes was demonstrated by performing quantitative RT-PCR. This meant that the genes were actually transcribed into RNA. For this, total RNA was isolated from leaves of greenhouse-grown material and converted into cDNA by reverse transcriptase and oligo(dT) and random primers. Using labeled specific primers for the genes and an endogenous reference a quantitative real-time PCR was performed based on a colour real-time detection system. Expression levels could be determined.
Translation into proteins was determined biochemically. SDS polyacrylamide gelelectrophoresis followed by staining, a method to screen for proteins, showed the presence in lily GMHP of an extra protein band of 20 kDA compared to the non-GM isogenic cultivar. This is the expected size of equistatine.

SPME-GCMS and LCMS were used to demonstrate the presence of emitted linalool or cell-contained linalool conjugates respectively.

Greenhouse assays testing for insect resistance were done using both choice and non-choice experiments. A choice assay provides an indication for the presence and action of volatile repellents. When given a choice between leaves of a non-GM isogenic plant and leaves of the GMHP 90% of the aphids were found present on the non-GM control leaves after 6 hours. In non-choice assays a specific number of aphids is loaded onto plants (controls as well as GMHPs) and given no choice but to stay and feed on those plants. After three weeks the number of adults and juveniles is counted. In this way the effect of equistatine can be determined. Survival and fecundity was significantly reduced on the GMHPs.

- (b) Parts of the plant where the insert is expressed (e.g. roots, stem, pollen, etc.):
The linalool synthase gene is under control of the 35S promoter which gives constitutive expression in all plant parts. Expression of the equistatine gene is regulated by the rubisco small subunit promoter which is light-regulated and highly and primarily active in green tissues or in tissues with an active photosynthetic system. Activity in roots and fully-opened and colored flowers or in pollen is low.

22. Information on how the GMHP differs from the recipient plant in

- (a) Mode(s) and/or rate of reproduction:
Mode(s) or rate of reproduction have not changed.
- (b) Dissemination:
No changes in vegetative propagation (in the field as well as in vitro) have been observed up till now. No changes in pollen production or in fertility/viability of the pollen have been observed and no changes in seed set (after crosses to determine Mendelian inheritance) have been observed compared to the recipient plant.
- (c) Survivability:
Lily flowers are not killed by aphids, nor by viruses, although they can be weakened. Plant quality can be greatly affected leading to a severe reduction in the economic yields. Virus infection can lead to irregular mottling or flecking of the leaves, a reduction in plant size, distorted growth, color-breaking in flowers and brown rings on bulbs. Lily cultivation practice does not allow much spread or volunteers. This means that whether or not a lily is resistant or susceptible to aphids has little relevance for survivability. Hence, no change.
- (d) Other differences:
The difference lies in the acquired resistance to insects such as aphids as a result of the genetic modification. No other differences have been observed till now.

23. Potential for transfer of genetic material from the GMHP to other organisms:

The potential for transfer of genetic material from the GMHP to other Oriental hybrid lily plants belonging to the same section Archelirion is similar as from non-GM Oriental hybrid cultivars (see paragraphs 11a and 22b) and hence considered to be very low. Transfer to other *Lilium* species of other members of the *Liliaceae* family is even lower. Transfer to other organisms is extremely low or non-existent, as it is now for non-GM lilies to transfer their genetic material to other organisms.

24. Information on any harmful effects on human health and the environment, arising from the genetic modification:

As mentioned in paragraph 14, all members of the genus *Lilium* are toxic and human consumption should be avoided. Similarly, the GMHP lily will be toxic

but not as a result from the genetic modification. Linalool is a compound present in many crops; this particular gene was isolated from strawberry, an edible fruit crop highly appreciated, broadly consumed and not toxic. Many plants, such as the food crop potato, contain genes coding for proteinase inhibitors. Especially in storage organs, such as seeds, fruits and tubers they can accumulate to levels as high as 50%. Insect feeding on aerial parts of the plants induces their accumulation there. Such proteins affect insects only, not humans nor mammals. Insects carry several different types of proteases in their gut and therefore, plants need to have several different types of proteinase inhibitors available for efficient defense. Those are not present in every plant or in every part of the plant. It has also been found that insects adapt to PI's present within plants by developing novel types quite readily. Proteinase inhibitors from animal sources such as the equistatine used here, are proven to be more effective against insects than plant-derived PI's, hence the choice for equistatine. Human consumption of the GM-lilies will not take place, as consumption of any non-GM lily, because of their general toxic nature. This will also preclude any allergenicity issues based on ingestion.

25. Information on the safety of the GMHP to animal health, where the GMHP is intended to be used in animal feedstuffs, if different from that of the recipient/parental organism(s):

The toxic nature of all members of the genus *Lilium* to animals, especially cats, is well-known and described. Vets know how to deal with this. This toxicity is not due to the genetic modification. Lilies are in no way part of any animal feedstuff

26. Mechanism of interaction between the GMHP and target organisms (if applicable), if different from that of the recipient/parental organism(s):

Insect resistance in the GMHP is based on a dual approach. First, the volatile monoterpene linalool is synthesized, which acts as a repellent. It is perceived by the olfactory system of aphids and when exposed long enough the aphids will choose to avoid plants emitting linalool and go elsewhere. Choice assays have shown this effect. After an exposure time of six hours 90% of the aphids were found present on non-emitting non-GM leaves.

In open fields the repellent effect on its own might not be sufficiently effective. Therefore, the GMHP also contains a gene coding for equistatin, a potent inhibitor of two types of proteinases, i.e. cysteine and aspartic acid type proteinases. Proteinase inhibitors are present in animals and plants and in plants they are induced upon herbivory by insects. In the guts of insects proteases are present on which the insect relies for digestive proteolysis, protein degradation, necessary for growth and development. The main types in insects are serine, cysteine or aspartic acid types.

Equistatine interacts with cysteine and aspartic acid proteases by complexing and hereby inhibiting their action. Amino acids will not become available to the insect or its larvae and growth will stop and fecundity will be reduced. This will prevent normal build-up of a viable population in the lily production fields.

Proteinase inhibitors do not act instantly; insect can seek refuge in other crops or fields. It has been found that insects can detect plants or plots with highly induced presence of PI's and will stay clear of them.

27. Potentially significant interactions with non-target organisms, if different from the recipient or parental organism(s):

Primary targets are aphids such as the green peach aphid (*Mysus persicae*) and the cotton aphid (*Aphis gossypii*), however it is known from literature that linalool also repels thrips and proteinase inhibitors also affect thrips,

caterpillars and beetles, all herbivorous insects, usually considered pathogens or pests. Also in these cases the GMHP will not have an instant lethal effect, enough refuges will be present, population build-up in the fields will be reduced. There could be an effect on pollinators, such as bees. However, in plants carrying a proteinase inhibitor gene under control of the 35S promoter no PI could be detected in pollen. Only a very limited number of plants will be allowed to flower in the field so pollen production will be very low. In addition, the effect of feeding purified PI protein mixed with non-GM pollen showed that PI's in concentrations expected to be present in case of pollen from GM-plants expressing PI-genes did not have an effect on mortality or learning ability of honey bees. In higher dosages there was a negative effect on honey bee longevity. The effect on bumble bees was similar but depended on the type of PI fed. No effect on honey bees was seen comparing GM plants expressing PI and their non-GM isogenic line in oilseed. In summary, the effect when fed purified PI depended on the specificity of the inhibitor and on the concentration. In the field bees do not preferentially visit lilies to collect pollen, the amount of pollen produced will be low and the percentage of GM lily pollen fed to young bees in a hive will be negligible.

28. Description of detection and identification techniques for the GMHP, to distinguish it from the recipient or parental organism(s):

The GMHP can be distinguished using DNA based identification methods such as Southern analysis and PCR. A specific PCR based identification method has been developed using a specific primer pair to amplify a sequence unique to the GM product.

INFORMATION ON THE POTENTIAL ENVIRONMENTAL IMPACT FROM THE RELEASE OF THE GMHP

29. Potential environmental impact from the release or the placing on the market of GMOs (Annex II, D2 of Directive 2001/18/EC), if different from a similar release or placing on the market of the recipient or parental organism(s):

The environmental impact of the GMHP will be almost totally similar to a release or market introduction of the recipient or parental organism. The only difference will reside in the fact that population build-up of herbivorous insects will be reduced in the production fields. As none of the insects is solely dependent on lily plants or flowers for its survival and reproduction and because the action is not immediate and many refuges exist, the environmental impact will be negligible. Even the scarlet lily beetle (*Liriocercis lillii*) is very able to feed on other members of the *Liliaceae* family.

The main negative effect of insect attack in lilies is the transfer by them of viruses. Preventing insect damage or virus-induced damage will not turn cultivated ornamental lily hybrids into weeds. Recipient, non-GM lilies during centuries of cultivation did not become weeds either.

30. Potential environmental impact of the interaction between the GMHP and target organisms (if applicable), if different from that of the recipient or parental organism(s):

The only difference will reside in the fact that population build-up of herbivorous insects, i.c. aphids, will be reduced in the production fields. As neither the green peach aphid, nor the cotton aphid is solely dependent on lily plants or flowers for its survival and reproduction and because the action is not immediate and many refuges exist, the environmental impact will be negligible.

31. *Possible environmental impact resulting from potential interactions with non-target organisms, if different from that of the recipient or parental organism(s)*

- (a) Effects on biodiversity in the area of cultivation:
Negligible, see 29.
- (b) Effects on biodiversity in other habitats:
Negligible, see 9a, 9b, 10a, 11, 12, 13, 15, 22b, 22c, 29
- (c) Effects on pollinators:
Negligible, see 27
- (d) Effects on endangered species:
Not applicable. There are no endangered species in the cultivation areas in Europe. No endangered species will be exposed to non-GM or GM cultivated Oriental hybrid lilies in their natural habitat.

C. INFORMATION RELATING TO PREVIOUS RELEASES

Not applicable (zie opmerking bij punt 4)

32. *History of previous releases notified under Part B of the Directive 2001/18/EC and under Part B of Directive 90/220/EEC by the same notifier:*

- (a) Notification number:
- (b) Conclusions of post-release monitoring:
- (c) Results of the release in respect to any risk to human health and the environment (submitted to the Competent Authority according to Article 10 of Directive 2001/18/EC):

33. *History of previous releases carried out inside or outside the Community by the same notifier*

- (a) Release country:
- (b) Authority overseeing the release:
- (c) Release site:
- (d) Aim of the release:
- (e) Duration of the release:
- (f) Aim of post-releases monitoring:
- (g) Duration of post-releases monitoring:
- (h) Conclusions of post-release monitoring:
- (i) Results of the release in respect to any risk to human health and the environment:

D. INFORMATION RELATING TO THE MONITORING PLAN - IDENTIFIED TRAITS, CHARACTERISTICS AND UNCERTAINTIES RELATED TO THE GMO OR ITS INTERACTION WITH THE ENVIRONMENT THAT SHOULD BE ADDRESSED IN THE POST COMMERCIALISATION MONITORING PLAN:

Specific monitoring

Since the environmental risk assessment does not identify any potential risks, a specific monitoring plan has not been included.

General monitoring

- 1) In the vicinity of production fields there will be a yearly check for volunteers or dispersed GM lily bulbs and plants. It is suggested to check neighbouring zones of 50 metres.
- 2) New insect resistant varieties will be checked for the presence of the transgenes mentioned in this notification.
- 3) Notifier will keep track of all companies growing the GM variety, of the quantity of GM bulbs and flower stems produced and auctioned.
- 4) Growers, flowering forcers, auctioneers and retailers will be asked for feed-back on anything out-of-the-ordinary regarding the GM lilies every year.
- 5) The European consumers will be given the opportunity to learn about the GM lily and its added traits, goals, performance and accumulated beneficial effect on reduction of the use of chemical crop protectants in lily cultivation through a website maintained by the notifier.
- 6) After release, breeders and botanists with an interest in *Lilium* biology will be asked to alert the notifier in case of any unusual hybrids that they might find during survey work.

Bijlage III.

Werkdocument aanvraag introductie in het milieu van gentech lelies met luisresistentie, veldproef categorie 1 plus markttoelatingsaspecten.

Een eerste vraag is of we een aanvraag opstellen voor meerdere gentech rassen tegelijk en voor meerdere productvormen. We hebben mogelijk vijftien verschillende gentech lelierassen, vier *Oriental*s en één OT hybride. De productvorm van deze rassen is als snijbloem; de vraag is dus of het interessant genoeg is om ook de potvarianten van deze rassen in de aanvraag op te nemen.

De productvorm potplant is de vorm waarin lelies in tuinen kunnen voorkomen naast de echte productievelden met de snijbloemvariant. De meeste lelietypen worden ook als potvariant aangeboden, waaronder in ieder geval *Oriental*s en OTs. Voor een evaluatie van de uitkruisings- en verspreidingsmogelijkheden moet dit meegenomen worden, ook voor de snijbloemvariant.

De manier waarop en het gemak/de moeite waarmee OTs uit kruisingen tussen *Oriental*s en Trumpets gemaakt kunnen worden, zal weergegeven moeten worden. Duidelijk stellen dat er in het wild in Europa geen kruisbare verwanten voorkomen van beide lelie hybride typen.

Een inventarisatie is nodig van insecten die op lelies vliegen en voor bestuiving kunnen zorgen in Europa. Is het aangeven met een aantal specifieke voorbeelden van insecten al voldoende? De mate van voorkomen en waar in Europa welke? Of gewoon aangeven, ze zijn er en ze zullen pollen verspreiden als er pollen gevormd wordt. Hoeveel bestuiving, bevruchting, zaadvorming wordt er nu waargenomen, in productievelden (restindividuen) en in tuinen met de non-GM lelies? Hoe lang is leliepollen levensvatbaar? Worden er in de reguliere teelt al maatregelen genomen om verspreiding tegen te gaan en zo ja, welke? Is dit informatie die voor een categorie 1 veldproef aanvraag al nodig is?

Toxiciteitsvragen over de nieuw geïntroduceerde genproducten zijn relevant ondanks het feit dat alle Liliaceae van zichzelf reeds giftig zijn. Gegevens over de toxiciteit van equistatine en van het linalool synthase en het product ervan, linalool (vrij of in geconjugeerde vorm) moeten verzameld en gemeld in de aanvraag. Is dit informatie die voor een categorie 1 veldproef aanvraag al nodig is? Ik ben nog wel benieuwd naar de argumentatie van BGGO waarom de toxiciteit van de genproducten relevant is tegen de achtergrond van de bekende, eigen toxiciteit van lelie-achtigen. Als het gaat om een vermeende toename van de toxiciteit is de vraag, kan je dat meten en hoe relevant is dat als de consument nu reeds zijn gedrag heeft aangepast en inname vermijdt. Toxiciteitstoetsen zoals beschreven in de Florigene aanvragen voor GM anjers zijn voor een categorie 1 veldproef aanvraag nog niet nodig. Concrete vragen blijven welke van de drie toetsen nodig zijn voor de beoordeling (wisselend aanbod in de verschillende Florigene aanvragen!) en bij welke aanvraag (categorie 2,3 of markttoelating) en hoe in die beoordeling wordt omgegaan met de eigen toxiciteit van lelie en het effect daarvan op de uitkomsten van de toxiciteitstoetsen? De toxiciteitsscreening van de flankerende gebieden moet op suggestie van BGGO worden uitgevoerd m.b.v. zoektochten in databanken (NCBI) naar overeenkomsten van de geïdentificeerde chimere DNA sequenties vertaald naar eiwit/aminozuur niveau met bekende toxines (Blastx). Dit is nog niet nodig voor categorie 1; wanneer wel?

Werkingsmechanismen van de nieuw geïntroduceerde genproducten moeten zo gedetailleerd mogelijk beschreven worden. De vraag is hoeveel informatie er nu nodig is voor de beoordelende instantie om tot een oordeel te kunnen komen. Soms is het precieze mechanisme niet bekend en zijn er slechts hypothesen en waarnemingen. Wanneer is het genoeg? Duidelijk door de overheid omschreven criteria zijn gewenst.

Uit de categorie 1 en later categorieën 2 en 3 moet informatie komen die nodig is voor de volgende fase en uiteindelijk voor een markttoelating. Dit zal betrekking hebben op in hoeverre de modificatie invloed heeft op aspecten van wijze van reproductie, disseminatie, overleving en 'overige verschillen'. De vraag is ook hier weer welke informatie precies nodig is, kortom heldere criteria/eisen.

De kans op allergeniciteit van de nieuw geïntroduceerde genproducten kan op basis van de aminozuursequentie van de eiwitten en bekende epitopen bekeken worden, maar dit betreft vooral allergische reacties na ingestie. BGGO suggereerde dat ook informatie nodig is over mogelijke allergische reacties bij het hanteren van de bloemen, contactallergie. Mensen, werkzaam in de tuinbouw, paprika, ontwikkelen allergie tegen paprikastuifmeel; toch is het niet verboden paprika's te telen. Is dit echt een eis om dit vooraf getoetst te hebben i.p.v. het te constateren als het al optreedt en dan maatregelen te nemen? Bij welke aanvraag hoort deze informatie dan aangeleverd te worden? Mij is onbekend of dat dit ook bij de op dit moment toegelaten gewassen (mais en soja bijvoorbeeld) is gevraagd. Het roept direct wel de nodige vragen op, zoals hoe kan contactallergie getoetst worden anders dan door proeven met personen? Moeten die al een bepaalde bekende gevoeligheid hebben of volstaat een volkomen willekeurige doorsnede? Hoe groot moet de steekproef zijn? Hoe lang moeten mensen blootgesteld worden? Ook hier moet een zoektocht worden uitgevoerd in databanken (bijv. SwissProt) naar overeenkomsten van de geïdentificeerde chimere DNA sequenties vertaald naar eiwit/aminozuur niveau met bekende allergene sequenties (epitopen; via bijv. allermatch). Is deze zoektocht het antwoord op de hiervoor gestelde vragen?

Toelichting is ook nodig op de vraag in het BGGO commentaar naar 'non-target studies op vertegenwoordigers van alle functionele groepen in zowel het lab als het veld'? Betreft dit mensen of dieren of allebei? Wat houden die studies precies in, wat zijn de eisen/criteria? Er wordt verwezen naar testen die voor Bt gewassen nodig zijn. Graag vernam ik waar ik die testen kan vinden. Kan het zijn dat beschrijvingen van observaties die al of niet gedaan zijn tijdens de veldproeven categorie 1,2 en 3 hiervoor voldoende zijn?

In hoeverre moet een eventueel toxisch effect op de bodem bestudeerd zijn? Kan dit d.m.v. een theoretische verhandeling over werkingsmechanismen van genproducten en de te verwachten persistentie, dit in aanvulling op de databanken informatie of moeten er daadwerkelijk proeven gedaan worden? Zo ja, welke? De door BGGO genoemde 'slazaad' toets die in het anjerdossier gegeven zou zijn, blijkt in het meest recente anjerdossier niet opgenomen!

De effecten op het milieu dienen uitgebreider beschreven te worden. Ook hier is weer de vraag wat er precies moet worden aangeleverd, wanneer is het voldoende? De anjeraanvragen konden hier geen antwoord op geven. Ook die waren niet zo uitgebreid.

De monitoring moet uitgebreider beschreven. Duidelijkheid in wat wordt verstaan onder specifieke monitoring en wat onder algemene is een voorwaarde en ook duidelijkheid t.a.v. de essentiële punten annex minimale eisen.

Wageningen, november 2011

Dr. F.A. Krens, PT13973