

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
mevrouw S.A.M. Dijkma
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 03 november 2015
KENMERK CGM/151103-01
ONDERWERP Categorie 2 veldproef met gg-appelbomen met een verhoogd anthocyaangehalte

Geachte staatssecretaris Dijkma,

Naar aanleiding van een adviesvraag over de vergunningaanvraag IM-L 15-001 met als titel 'cisgene appels met rood vruchtvlees' deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de milieurisico's van een categorie 2 veldproef met genetisch gemodificeerde (gg-) appelbomen (*Malus pumila*) met een verhoogd anthocyaan gehalte. Doordat deze gg-appelbomen meer anthocyaan produceren hebben de appels en bladeren een rode kleur.


De COGEM concludeert dat de vergunningaanvraag voldoet aan de vereisten van een categorie 2 veldproef. De sequenties waarmee de appelbomen genetisch zijn gemodificeerd, zijn afkomstig van het conventionele appelras 'Red Field'. Eventuele veranderingen van de gg-appelbomen die door insertie van deze sequenties worden veroorzaakt, zullen naar verwachting overeenkomen met de conventionele 'Red Field' appelbomen.

De aanvrager neemt maatregelen om de verspreiding van gg-appels en gg-appelzaad te voorkomen. Bevruchting van andere (sier)appelbomen kan niet volledig uitgesloten worden.

Vruchtvlees van appels bestaat uit weefsel van de moederplant. Wanneer na bevruchting met gg-pollen een appel wordt gevormd, zal het vruchtvlees dus geen genetisch materiaal van de gg-appelbomen bevatten. Wel zou eventueel gg-appelzaad kunnen ontstaan. Er bestaat een kleine kans dat dit zaad tot een verwilderde appelboom uitgroeit. Eventueel gevormd gg-zaad zal niet gebruikt worden voor het opkweken van nieuwe appelbomen, omdat de appelbomen in boomgaarden afkomstig zijn van boomkwekerijen en het resultaat zijn van vegetatieve vermeerdering.

Op basis van de aangeleverde gegevens kan niet uitgesloten worden dat de gg-appelbomen ook zogenaamde vector backbone sequenties bevatten. De COGEM is van mening dat de eventuele aanwezigheid van deze sequenties geen milieurisico met zich mee zal brengen.

Vanwege bovenstaande overwegingen is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu van deze categorie 2 veldproef met gg-appelbomen verwaarloosbaar klein zijn.



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

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

Veldproef met genetisch gemodificeerde appelbomen met een verhoogd anthocyaangehalte

COGEM advies CGM/151103-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de milieurisico's van een categorie 2 veldproef met genetisch gemodificeerde (gg-) appelbomen (*Malus pumila*ⁱ). De gg-appelbomen worden geënt op conventionele onderstammen. De gg-bovenstammen bevatten MdMYB10(R6) sequenties die uit het conventionele appelras 'Red Field' zijn geïsoleerd. De MdMYB10(R6) expressiecassette zorgt voor een verhoogde expressie van het *MdMYB10* gen waardoor er meer anthocyanen worden geproduceerd en verschillende delen van de appelboom, waaronder de appels, rood kleuren.

De vergunningaanvrager, Plant Research International B.V. wil de kleur van de gg-appels beoordelen en het niveau van anthocyaan in het vruchtvlees bepalen. Ook wordt de roodkleuring van stam, takken en bladeren van de gg-appelbomen gemonitord. Dit gebeurt om te bepalen of er verschillen bestaan tussen de gg-appelbomen en om te onderzoeken of de eigenschap stabiel is.

De veldproef wordt uitgevoerd op één locatie in de gemeente Wageningen. Op deze locatie worden ook gg-appelbomen met schurftresistentie geteeld.

2. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft diverse malen geadviseerd over veldproeven met gg-appelbomen. In 2010 heeft zij geadviseerd over gg-appelbomen die het *HcrVf2* gen tot expressie brengen en daardoor resistent zijn voor appelschurft.¹ Deze gg-appelbomen staan op de locatie waar ook de veldproef met de gg-appelbomen van de huidige vergunningaanvraag is gepland.

De COGEM heeft daarnaast verschillende keren geadviseerd over gg-appelbomen (*M. pumila*) met schimmelresistentie.^{2,3,4,5,6} In het merendeel van deze vergunningaanvragen kwamen de gg-appelbomen niet tot bloei.^{2,4,5,6}

3. Milieurisicoanalyse

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

Onder risico wordt verstaan de gevolgen van een gevaar in combinatie met de kans dat deze gevolgen zich voordoen. De mogelijke schadelijke effecten van (toepassing van) een ggo worden daarbij vergeleken met die van het ongemodificeerde organisme, de zogenaamde 'baseline',

ⁱ In de loop der tijd zijn er veel verschillende wetenschappelijke namen geweest voor de gecultiveerde appel, zoals *Malus pumila*, *M. communis*, *M. sylvestris* en *M. domestica*.¹⁰ Recente bronnen beargumenteren dat *Malus pumila* de correcte wetenschappelijke naam is voor de gecultiveerde appel.^{9,12} *Malus domestica* is echter de naam die het meest wordt gebruikt en een voorstel om deze naam te behouden, is ingediend.¹⁰

waaruit het ggo is afgeleid. Bij de introductie in het milieu wordt door de COGEM de staande landbouw en de klassieke veredeling als ‘baseline’ voor genetische gemodificeerde gewassen gebruikt.⁷

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

Bij de huidige aanvraag kijkt de COGEM naar de risico’s voor mens en milieu die verbonden zijn aan de introductie in het milieu van gg-appelbomen met een verhoogd anthocyaangehalte die zijn geënt op niet-genetisch gemodificeerde onderstammen. Omdat op dezelfde locatie ook gg-appelbomen met schurftresistentie worden beproefd, kijkt de COGEM bij deze vergunningaanvraag ook naar mogelijke risico’s van eventuele nakomelingen met beide geïntroduceerde eigenschappen, d.w.z. een verhoogd anthocyaangehalte en schurftresistentie.

Zowel directe als indirecte effecten worden beoordeeld. Hierbij zijn de kans op verspreiding door bijvoorbeeld pollen of zaden, het eventueel uitkruisen van appel met wilde verwanten of andere verwanten, mogelijke veranderingen in persistentie en invasiviteit van de plant en verwildering van belang. Daarnaast wordt gekeken naar eventuele nadelige effecten indien de ingebrachte genen zich in het milieu zouden verspreiden. Ook incidentele consumptie, vraat en daarbij mogelijk optredende toxische of allergene effecten op mens en dier zijn onderwerp van de risicoanalyse. Bovendien worden eventuele effecten op niet-doelwitorganismen bestudeerd. Effecten op niet-doelwitorganismen zouden kunnen leiden tot verstoring van voedselketens of ecosystemen. Een eiwit kan mogelijk intact blijven in insecten, waarna het door insecten verspreid kan worden vanuit het proefveld. Mogelijke effecten op de bodemmicroflora zouden een verstoring in de nutriëntenkringloop in de bodem als gevolg kunnen hebben.

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

De COGEM heeft eerder richtlijnen opgesteld voor de beoordeling van veldproefaanvragen met gg-planten.⁸ Teneinde mogelijke milieurisico’s te voorkomen, worden in deze richtlijnen criteria beschreven voor een categorie-indeling van veldproeven. Wanneer weinig kennis beschikbaar is, worden alleen kleinschalige werkzaamheden toegelaten waarbij eventuele nadelige effecten verregaand ingeperkt moeten worden. Bij grootschalige veldproeven met minder inperkende

voorschriften is meer kennis van het ggo vereist. Deze kennis kan bijvoorbeeld verkregen worden uit eerdere kleinschalige veldproeven of uit andere bronnen.

4. Opzet en omvang van de veldproef

Voor de veldproef zijn verschillende conventionele appelrassen genetisch gemodificeerd. Het appelras ‘Junami’ is twee keer gebruikt en het appelras ‘Gala’ is één keer gebruikt als uitgangsmateriaal. De gg-appelbomen zijn vervolgens klonaal vermeerderd, zodat er nu van elk van de drie oorspronkelijke transformanten drie afgeleide gg-appelbomen zijn. In het eerste jaar bestaat de veldproef uit deze negen gg-appelbomen. Deze worden verder vermeerderd, zodat er in het tweede jaar per transformant nog tien gg-appelbomen bij geplaatst zullen worden. In totaal staan er vanaf het tweede jaar van de veldproef dus 39 gg-appelbomen. De gg-appelbomen worden op één locatie van 1.750 m² geplaatst. De grootte van de veldproef voldoet daarmee aan de maximale omvang voor een categorie 2 veldproef.

De aanvrager heeft ook een vergunning voor een categorie 2 veldproef met gg-appelbomen met schurftresistentie. Deze appelbomen zijn verkregen door genetische modificatie van het conventionele appelras ‘Gala’ en bevatten het *HcrVf2* gen afkomstig van *Malus floribunda*.¹ De aanvrager zal de gg-appelbomen met een verhoogd anthocyaangehalte op dezelfde locatie planten als de schurftresistente gg-appelbomen. In de beschikking voor de schurftresistente gg-appelbomen staat dat er binnen een afstand van 150 meter geen andere appelbomen voorkomen en dat er binnen een afstand van 500 meter van het perceel geen appelboomgaarden aanwezig zijn.

De veldproef is omgeven door een gaasafscherming van 1,80 tot 2,00 meter hoog om versleping van plantmateriaal en schade door konijnen, hazen en reeën te voorkomen. Daarnaast zal tijdens de periode waarin appels worden gevormd, gaas worden aangebracht om te voorkomen dat vogels de appels verslepen of aanvreten.

5. Eigenschappen van het gewas

5.1 Taxonomie

De gecultiveerde appel (*M. pumila*)⁹ behoort tot de familie van de *Rosaceae*.¹⁰ Tot deze familie behoren ook andere fruitsoorten, zoals Peer (*Pyrus communis*), Aardbei (*Fragaria x ananassa*) en Framboos (*Rubus idaeus*).¹¹ De huidige appelrassen zijn nauw verwant aan de wilde appelsoort *Malus sieversii*, de sierappelsoorten *Malus x asiatica*, *Malus baccata*, *Malus micromalus*, *Malus orientalis*, *Malus prunifolia* en de wilde Appel (*Malus sylvestris*).¹²

5.2 Vermeerdering, bloei en oogst van gecultiveerde appels

De gecultiveerde appel wordt professioneel vermeerderd op boomkwekerijen. Dit gebeurt door vegetatieve vermeerdering waarbij een stuk stengel of een knopje (‘oog’) op een onderstam wordt geënt.¹³

Appelboomgaarden bestaan vaak uit meerdere appelrassen en soms worden ook sierappelsoorten aangeplant. Dit gebeurt omdat de meeste appelrassen obligate kruisbestuivers zijn die niet door zijn hun eigen pollen of door pollen van hetzelfde ras bestoven kunnen worden.³³ Hoewel er ook verschillende zelfbestuivende appelrassen zijn,¹⁴ is ook bij deze appelrassen de opbrengst hoger wanneer er ander pollen aanwezig is. De appels worden gewoonlijk 3,5 tot 5 maanden na de bloei geoogst.¹³

5.3 Vorming en verspreiding van pollen

Hoewel uit de wortels van appelbomen opslagplanten kunnen ontstaan,¹⁵ plant appel zich in de natuur meestal voort via seksuele voortplanting. Bij appelbomen duurt het ongeveer 3 tot 8 jaar voordat de appelboom voor het eerst gaat bloeien.^{16,17} De appelboom bloeit in april en mei.¹¹

Het pollen van appel wordt voornamelijk verspreid door insecten.^{18,19} De honingbij is het belangrijkste insect voor de bestuiving van appelbomen,^{18,19,20} maar ook solitaire bijen, hommels¹⁹ en vliegen²¹ kunnen zorgen voor bestuiving. De afstand waarmee pollen door insecten wordt verspreid, is afhankelijk van het foeragegedrag van de insecten.¹⁹

Het merendeel van het pollen legt een korte afstand af. Bij een toenemende afstand wordt de hoeveelheid pollen snel minder. In een onderzoek waarbij een rode appelboom als pollendonor fungeerde, bleek binnen 10 meter 2,7-5,0% van het zaad door de rode appelboom bevrucht, bij een afstand tussen de 61 en 105 meter nam dit af tot 0,3-0,5%.¹⁹ Uit onderzoek met transgene bomen bleek op 12 meter afstand van de bomen 20% van het gevormde zaad transgeen, terwijl dit bij een afstand van 18 meter afnam tot 1,7%.²⁴

Er zijn daarnaast verschillende studies uitgevoerd in boomgaarden naar de maximale afstand waarbij nog bevruchting plaats kan vinden. De gevonden maximale afstanden waren 85,5, 104 en 150 meter.^{22,19,23} Bij een Canadese studie waarbij o.a. is gekeken naar de afstand waarbij appelbomen uit verschillende boomgaarden elkaar nog kunnen bevruchten, bleek bij een afstand van maximaal 137 meter nog bevruchting op te treden. Bij grotere afstanden werd geen bevruchting meer waargenomen.²⁴ Een Deens onderzoek richtte zich op de afstand waarop pollen van de wilde Appel nog een andere wilde Appel boom kon bevruchten. De gevonden maximale afstand was 300 meter.²⁵ Bij het merendeel van deze studies werd bevruchting aangetroffen bij de maximale afstand waarbij nog waarnemingen werden gedaan. Het is daarmee niet uit te sluiten dat ook over grotere afstanden nog bevruchting plaats kan vinden.

Bij appel kan ook via wind verspreid pollen tot kruisbestuiving leiden.²⁶ Bij een Duitse studie bleek op 20 meter van de bron nog pollen te worden aangetroffen.¹⁹ Het is niet bekend of pollen van appel zich door wind nog verder kan verspreiden, omdat dit de maximale afstand is die onderzocht is. Het pollen van Peer en appel is vergelijkbaar qua grootte.²⁷ Omdat er op 800 en 1200 meter afstand van een perenboomgaard nog pollen werd gevonden,¹⁸ is het waarschijnlijk dat ook het pollen van appel dergelijke grote afstanden kan afleggen. Het is echter niet bekend of pollen dat dergelijke grote afstanden heeft afgelegd nog levensvatbaar is.

5.4 Voorkomen van appel en andere (kruisbare) verwante soorten in Nederland

In Nederland is de gecultiveerde appel aangeplant in boomgaarden en tuinen, maar wordt daarnaast ook in verwilderde vorm aangetroffen in bossen en bermen.^{11,28,29}

Naast consumptieappels zijn vanwege hun sierwaarde ook veel sierappels aangeplant, onder andere *M. baccata*, *Malus floribunda*, *Malus toringo*, *Malus tschonoskii* en *Malus zumi*.^{30,31} Verschillende van de in Nederland voorkomende sierappelsoorten (o.a. *M. baccata*, *M. floribunda*, en *M. zumi*) kunnen kruisen met de gecultiveerde appel en fertiele nakomelingen opleveren.³²

Ook kan in Nederland de wilde Appel (*M. sylvestris*) op een beperkt aantal plaatsen worden aangetroffen.¹¹ De wilde Appel is een bedreigde boomsoort en wordt in kleine populaties of als individuele appelboom gevonden in bossen in Drenthe, het Maasdal, in de omgeving van Nijmegen, de Achterhoek en in het Zalkerbos in het stroomgebied van de IJssel bij Zwolle.^{28,33,34} De gecultiveerde appel kan kruisen met de wilde Appel (*M. sylvestris*). Hybriden tussen de gecultiveerde appel en de wilde Appel (*M. sylvestris*) zijn beschreven en ook introgressie van DNA tussen beide appelsoorten is gerapporteerd.^{28,29,33,35,36,37}

5.5 Verspreiding van appels, appelzaad en het ontstaan van opslagplanten

Afgevallen appels worden gegeten door dieren zoals konijnen, hazen, dassen en muizen. Vogels kunnen appels aanpikken en daardoor schade aan de vruchten veroorzaken.³⁸ Zowel vogels als zoogdieren kunnen appels en daarmee ook de zaden van de appel verspreiden.²⁰ De grootste verspreider van appelzaad is de mens. Deze verspreidt het zaad door het weggooiën van klokhuizen. Na een koudeperiode van drie maanden kan het zaad dat in de klokhuizen aanwezig is ontkiemen. Uit weggegooide klokhuizen kunnen daarna gemakkelijk opslagplanten groeien.¹¹ Het merendeel van de opslagplanten van appel die aan boskanten, langs sloten en in bermen teruggevonden worden, is hoogstwaarschijnlijk ontstaan uit het zaad van weggegooide klokhuizen.^{11,20,28,29} Deze opslagplanten kunnen in sommige gevallen uitgroeien tot een volwassen appelboom.

6. Beschrijving van de ingebrachte eigenschappen

6.1 de MdMYB10 transcriptiefactor

De gg-appelbomen zijn gemodificeerd met de MdMYB10(R6) expressiecassette om het anthocyaangehalte van de appels te verhogen.

De MdMYB10 transcriptiefactor behoort tot de zogenaamde R2R3 MYB transcriptiefactoren. Deze transcriptiefactoren vormen samen met een basic helix-loop-helix (bHLH) transcriptiefactor en een WD40 eiwit een MBW eiwitcomplex. MBW eiwitcomplexen reguleren afhankelijk van hun associatie met een bepaalde MYB transcriptiefactor verschillende processen, zoals de vorming van anthocyanen, de vorming van haren, pigmentatie van de zaadhuid en de zuurgraad van de vacuole.³⁹ Er is in ieder geval één R2R3 MYB transcriptiefactor bekend die meerdere processen reguleert. In petunia reguleert de R2R3 MYB transcriptiefactor AN2 zowel de vorming van anthocyaan als de zuurgraad van de vacuole.⁴⁰

De MdMYB10 transcriptiefactor van appel reguleert de vorming van anthocyaan in o.a. de bladeren, en de schil en het vruchtvlees van appels. Naast *MdMYB10* zijn in appel nog twee andere

MYB genen aanwezig die de vorming van anthocyaan reguleren. *MdMYB1* en *MdMYBA* coderen beiden voor hetzelfde eiwit en reguleren de vorming van anthocyanen in de schil van de appel.⁴¹

6.2 Anthocyanen en hun functie

Anthocyanen worden net als andere flavonoïden (o.a. flavonolen, flavanolen, en tanninen) geproduceerd via de phenylpropanoïde pathway. Anthocyanen worden in het cytosol gevormd en daarna naar de vacuole getransporteerd waar zij worden opgeslagen.⁴² Afhankelijk van de pH in de vacuole geven zij een rode, paarse of blauwe kleur.⁴³

De productie van anthocyanen is afhankelijk van de hoeveelheid licht, de temperatuur en het ontwikkelingsstadium van de plant.⁴³ Zowel biotische (bijv. de aanwezigheid van pathogenen) als abiotische factoren (zoals koude of droogtestress) hebben invloed op het anthocyaangehalte in planten.⁴⁴

Anthocyanen die in het blad aanwezig zijn, beschermen de plant tegen verschillende soorten abiotische stress. Daarnaast beschermen anthocyanen in blad tegen schade door herbivoren, doordat de rode kleur herbivoren afschrikt, of doordat anthocyaan als chemisch afweermiddel werkt.⁴³ Anthocyanen die in bloemen of vruchten aanwezig zijn, verhogen de aantrekkelijkheid van de plant voor bestuivers en vruchtenetende dieren, zoals vogels.⁴³

Anthocyanen worden, met name vanwege hun werking als anti-oxidant, in verband gebracht met allerlei gezondheidsvoordelen. Zo zouden zij bescherming bieden tegen verschillende soorten kanker, cardiovasculaire- en verouderingsziekten, en werken als ontstekingsremmer.⁴⁵

6.3 Informatie over het effect van een verhoogde expressie van *MdMYB10* of verwante genen

Er zijn in de wetenschappelijke literatuur een aantal studies gepubliceerd waarbij het effect van een verhoogde *MdMYB10* expressie in planten is onderzocht.

Bij een vergelijking van de verschillende stoffen in het vruchtvlees van rode 'Red Field' met witte 'Pacific Rose' appels bevatten de 'Red Field' appels in tegenstelling tot de 'Pacific Rose' appels anthocyaan. In het vruchtvlees van beide appels werden dezelfde hoeveelheden 'phenolic acids', flavonoïden, chalconen en procyanidinen aangetroffen.⁴⁶

In 'Royal Gala' appels (die van nature wit vruchtvlees hebben) waarbij het *MdMYB10* gen tot overexpressie werd gebracht, werden in de schil naast veel cyanidine-3-galactoside ook cyanidine glucoside en drie afgeleiden van cyanidine pentoside aangetroffen. Dezelfde anthocyanen worden in lagere hoeveelheden ook in de schil van 'Red Field' appels aangetroffen, die van nature een *MdMYB10* sequentie bezitten waarbij het bindingsdomein in de promoter in zesvoud aanwezig is.⁴⁶

Het vruchtvlees van de 'Royal Gala' appels waarbij het *MdMYB10* gen tot overexpressie werd gebracht, bevatte een verhoogd gehalte aan diverse anthocyanen, proanthocyanidines en flavonolen. Al deze stoffen worden via de phenylpropanoïde pathway gevormd.

Daarnaast bleken ook veranderingen op te treden in de hoeveelheden van andere stoffen. De hoeveelheid fructose en glucose was verhoogd, terwijl de hoeveelheid sucrose was verlaagd. Daarnaast waren er kleine veranderingen in de hoeveelheid van de vluchtige stoffen hexenoic acid

en methyl-iso-eugenol. Onverwacht bleek ook de hoeveelheid β -caroteen, dat via een andere metabole route ('pathway') wordt gevormd, te zijn toegenomen.⁴⁷

Bij deze gg-appels werd door een proefpanel overigens geen smaakverschil waargenomen. De appels werden wel minder knapperig gevonden.⁴⁷

Bij muizen die werden gevoerd met een dieet waaraan deze appels was toegevoegd, bleek het transcriptieniveau van vier inflammatoire (met ontsteking gepaard gaande) genen in de dunne darm verlaagd. De vier genen coderen voor twee chemokine receptoren, een interleukine en een interleukine receptor. Ook waren de concentraties van verschillende eiwitmarkers voor 'immune modulation' in plasma (LTB₄, PGE₂ en TNF- α) verlaagd. Daarnaast bleken er verschillen te zijn in de microbiota in de darm van de muizen.⁴⁸

Expressie van het *MdMYB10* gen in *Arabidopsis thaliana* zorgt voor een verhoogde tolerantie voor osmotische stress. Onder osmotische stress omstandigheden werden in de planten met *MdMYB10* meer beschermende stoffen (flavonoïden, chlorofyl en proline) aangetroffen dan in wild-type planten.⁴⁹

Bij *A. thaliana* zorgt een verhoogde expressie van *MYB75* (ook bekend als *PAP1*) voor een toename van de productie van zowel anthocyanen als flavonolen. Planten met een verhoogde *MYB75* expressie bleken een negatief effect te hebben op generalistische plaaginsecten (*Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera litura* en *Helicoverpa armigera*). Het specialistische plaaginsect *Pieris brassicae* groeide juist beter op deze planten. Een verhoogde activiteit van de anthocyaan pathway bleek te leiden tot een herverdeling van quercetin/kaemperol metabolieten en had een negatief op de accumulatie van een metaboliet (kaempferol-3,7-dirhamnoside) die de plant tegen *P. brassicae* beschermt.⁵⁰

7. Karakterisering van de gg-appelbomen

De veldproef wordt uitgevoerd met appelbomen (*M. pumila*) waarvan de bovenstam genetisch is gemodificeerd m.b.v. *Agrobacterium tumefaciens*. De M9 onderstammen van de appelbomen zijn niet gemodificeerd.

7.1 Beschrijving van T-DNA en de gebruikte vector

De pMinMYB vector die bij de transformatie is gebruikt, bevat op het T-DNA gedeelte de *MdMYB10(R6)* expressiecassette. Deze expressiecassette bestaat uit het *MdMYB10* gen van het appelras 'Red Field' met diens eigen promotor en terminator.

De promotor van het *MdMYB10* gen bevat bij de meeste appelrassen één bindingsdomein van 23 baseparen dat de expressie van het eigen gen reguleert. Het *MdMYB10* gen uit 'Red Field' bevat zes kopieën van het bindingsdomein, waardoor de expressie van het *MdMYB10* gen wordt verhoogd.⁵¹ De expressiecassette wordt door de aanvrager aangeduid met *MdMYB10(R6)*.

Aan beide zijden van de *MdMYB10(R6)* expressie cassette zijn zogenaamde 'stopper sequenties' aanwezig. Door de aanwezigheid van deze 11 baseparen bevat elk van de zes leesramen een stopcodon waardoor het doorlezen vanuit het *MdMYB10(R6)* gen wordt verhinderd.

De backbone van de pMinMYB vector bevat verschillende sequenties. Direct naast de rechter T-DNA border ligt de zogenaamde ‘overdrive’ sequentie, die zorgt voor een efficiënte overdracht van het T-DNA naar het plantengenoom. Direct naast de linker T-DNA border ligt een recombinatiesite afkomstig van *Zygosaccharomyces rouxii*. Verder bevat de vector sequenties die een functie hebben bij de vermeerdering van het plasmide in bacteriën. Dit zijn RK2 (=oriV), ColE1 en het *trfA* gen. De backbone van pMinMYB bevat daarnaast het *nptIII* antibioticumresistentiegen.

7.2 Ingebrachte sequenties

De aanvrager heeft een PCR uitgevoerd om te controleren of de gg-appelbomen de MdMYB10(R6) expressiecassette bevatten. Bij deze PCR werden twee fragmenten gevormd. Eén van deze fragmenten komt overeen met de grootte van de endogene MdMYB10 sequentie van de conventionele appelrassen ‘Junami’ en ‘Gala’. Het andere fragment is groter en komt overeen met de grootte van de ingebrachte MdMYB10(R6) expressiecassette. Uit deze gegevens blijkt dat de gg-appelbomen de MdMYB10 en de MdMYB10(R6) sequenties bevatten.

Bij een PCR wordt alleen een fragment gevormd als beide primersequenties aanwezig zijn. Op basis van de aangeleverde gegevens kan daarom niet uitgesloten worden dat de gg-appelbomen fragmenten van de MdMYB10(R6) expressiecassette bevatten. Ook is het niet mogelijk om op basis van de gegevens te bepalen of er meerdere intacte MdMYB10(R6) expressiecassettes zijn geïnsereerd omdat eventuele extra MdMYB10(R6) expressiecassettes fragmenten van dezelfde grootte zullen opleveren. Voor een categorie 2 veldproef zijn gegevens over het aantal aanwezige inserties niet vereist en hoeft het niet bekend te zijn of de inserties bestaan uit een volledige T-DNA regio of uit fragmenten hiervan.⁸

De aanvrager concludeert op basis van PCRs met *nptIII* en *trfA* primers dat er geen backbone sequenties in de gg-appelbomen zijn geïnsereerd. De COGEM is van mening dat de aangeleverde gegevens niet voldoende zijn om deze conclusie te kunnen onderbouwen.

Zowel het *trfA* als het *nptIII* gen bevinden zich naast de linker T-DNA border op de vector. Er is niet onderzocht of andere delen van de vector backbone in de gg-appelbomen zijn geïnsereerd. De overdracht van T-DNA door *A. tumefaciens* begint bij de rechter T-DNA border, volgt de T-DNA regio (5' naar 3')⁵² en stopt normaal gesproken bij de linker T-DNA border. Wanneer de sequenties die naast de linker T-DNA border op de backbone liggen niet in het plantengenoom zijn geïnsereerd, zal het plantengenoom in de meeste gevallen ook geen andere delen van de vector backbone bevatten. Bij een transformatie kan echter ook DNA worden verwijderd (deleties) of worden herschikt (rearrangements). Hierdoor is het mogelijk dat een gg-plant backbone sequenties bevat, terwijl de naast de linker border gelegen sequenties niet (meer) aanwezig zijn. De COGEM is gezien het bovenstaande van mening dat op basis van gegevens over de *trfA* en *nptIII* genen geen conclusies getrokken kunnen worden over de aan- of afwezigheid van andere delen van de vector backbone.

Ook merkt de COGEM op dat de uitgevoerde PCRs alleen informatie leveren over de aanwezigheid van intacte *trfA* en *nptIII* genen. Op basis van de aangeleverde gegevens kan daarom niet uitgesloten worden dat de gg-appelbomen fragmenten van de *nptIII* of *trfA* genen bevatten.

Daarnaast wijst de COGEM erop dat de studies niet aan de standaard kwaliteitseisen voldoen. Bij de *nptIII* PCR wordt een specifiek fragment gevormd, bij de PCR die is uitgevoerd met mengsels van plasmide en conventioneel appel DNA bevat de negatieve controle een fragment, en de figuren zijn niet voorzien van de gebruikelijke informatie.

Samenvattend kan op basis van de aangeleverde gegevens niet uitgesloten worden dat de gg-appelbomen sequenties bevatten die afkomstig zijn van de backbone van de vector. Bij een categorie 2 veldproef mogen de gg-planten backbone-sequenties bevatten. De COGEM gaat er bij de door haar uitgevoerde risicobeoordeling vanuit dat backbone-sequenties aanwezig kunnen zijn.

7.3 Anthocyaangehaltes

De aanvrager heeft m.b.v. LC-PDA-MS onderzocht welke anthocyanen de bladeren van de gg-appelbomen bevatten. Uit dit onderzoek bleek dat de bladeren cyanidine glucoside bevatten. De hoeveelheid cyanidine glucoside was lager dan in de onderzochte sierappel (*Malus purpurea* 'Neville Copeman'), rode Beuk (*Fagus sylvatica*) en Japanse esdoorn (*Acer palmatum*). In de bladeren van de sierappel, rode Beuk en Japanse esdoorn werd naast cyanidine glucoside ook cyanidine rutoside aangetroffen. Cyanidine rutoside werd niet aangetroffen in de bladeren van de gg-appelbomen.

De aanvrager heeft geen gegevens aangeleverd over anthocyaangehaltes in de schil of het vruchtvlees van de gg-appels.

8. Overwegingen

De COGEM is gevraagd om te adviseren over een categorie 2 veldproef met appelbomen die genetisch gemodificeerd zijn met MdMYB10 sequenties afkomstig van het appelras 'Red Field'. Deze sequenties worden aangeduid met MdMYB10(R6). Bij deze natuurlijke MdMYB10 variant is de expressie van *MdMYB10* verhoogd en wordt er meer van deze transcriptiefactor geproduceerd.

8.1 Geen verspreiding via vegetatieve delen

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

8.2 Verspreiding van gg-appels en gg-zaad wordt voorkomen

De aanvrager wil deze gg-appelbomen plaatsen op dezelfde locatie als de veldproef met gg-appelbomen met schurftresistentie. Deze gg-appelbomen bevatten het *HcrVf2* gen dat afkomstig is van de sierappelsoort *M. floribunda*. De verschillende gg-appelbomen kunnen elkaar bevruchten. Hierdoor kan appelzaad worden gevormd met sequenties van één of beide gg-appelbomen.

De veldproef met gg-appelbomen is omgeven door een 1,80 tot 2,00 meter hoge gaasafscheiding om schade en versleping van plantmateriaal door zoogdieren te voorkomen. In de

periode waarin appels gevormd worden, wordt gaas aangebracht zodat vogels de appels niet kunnen beschadigen of meenemen. Ook verwijdert de aanvrager in de periode dat er appels zijn gevormd minimaal twee keer per week eventuele afgevallen appels. Hierdoor wordt verspreiding van gg-appels en gg-appelzaad voorkomen.

8.3 Pollen van de gg-appelbomen kan andere appelbomen bevruchten

Wanneer de gg-appelbomen bloeien, wordt het pollen van de appelbomen door insecten en wind verspreid. In Nederland komen verschillende wilde verwante soorten voor (andere gecultiveerde appels, diverse sierappelsoorten en de wilde Appel) die door gecultiveerde appelbomen kunnen worden bevrucht.

Het merendeel van het pollen legt een korte afstand af. De hoeveelheid pollen wordt met een toenemende afstand snel kleiner. Doordat er binnen een afstand van 150 meter van de veldproef geen andere appelbomen voorkomen en er binnen een afstand van 500 meter geen boomgaarden zijn, wordt de kans dat de gg-appelbomen andere appelbomen kunnen bevruchten geminimaliseerd.

Bevruchting van andere appelbomen is echter niet volledig uitgesloten. Na bevruchting kunnen appels ontstaan. Vruchtvlees van appels bestaat uit weefsel van de moederplant en bevat geen genetisch materiaal van de vaderplant. Wanneer een appelboom door gg-pollen wordt bevrucht, zal het vruchtvlees dus geen genetisch materiaal van de gg-appelbomen bevatten. Overigens kan pollen wel via het zogenaamde ‘metaxenia’ effect de kleur van de schil en de grootte, vorm en smaak van appels beïnvloeden.^{53,54} De verwachting is dat een eventueel ‘metaxenia’ effect overeenkomt met dat van andere appelrassen die van nature de MdMYB10(R6) sequenties bevatten, zoals het ‘Red Field’ appelras.

Zaad dat na bevruchting door gg-pollen wordt gevormd, zal wel genetisch materiaal van de gg-appelbomen bevatten. Hoewel de kans klein is dat dit zaad uitgroeit en tot een verwilderde appelboom leidt, is het ontstaan van nakomelingen niet uitgesloten. Eventueel zaad dat na bevruchting met gg-pollen ontstaat, zal niet gebruikt worden voor het opkweken van nieuwe appelbomen. Appelbomen die in boomgaarden worden geplant zijn afkomstig van boomkwekerijen en het resultaat van vegetatieve vermeerdering.

8.4 Ingebrachte MdMYB10(R6) expressiecassette vormt geen milieurisico

De gg-appelbomen bevatten een natuurlijke MdMYB10 variant waardoor de expressie van *MdMYB10* wordt verhoogd. Aan beide zijden van deze expressiecassette bevinden zich stoppersequenties (11 baseparen).

De MdMYB10 transcriptiefactor reguleert de vorming van anthocyaan in appelbomen (o.a. blad, schil en vruchtvlees van appel). Doordat de expressie van *MdMYB10* wordt verhoogd, neemt ook de hoeveelheid anthocyaan toe. Anthocyanen beschermen planten tegen verschillende soorten abiotische stress en hebben een afschrikwekkend effect op herbivoren.

Uit onderzoek van de aanvrager blijkt dat de hoeveelheid anthocyaan in de bladeren van de gg-appelbomen overeenkomt met (of lager is dan) de hoeveelheid anthocyaan in andere bomen met rode bladeren. De aanvrager heeft niet onderzocht of de hoeveelheid anthocyaan in de schil of het vruchtvlees van de gevormde gg-appels ook overeenkomt met dat van andere eetbare vruchten.

Door een toename van MdMYB10 kunnen ook de hoeveelheden van andere in appelbomen aanwezige metabolieten veranderen. Bij *A. thaliana* leidde de expressie van *MdMYB10* of *MYB75* niet alleen tot veranderingen in het anthocyaangehalte, maar ook tot veranderingen in de gehalten van andere metabolieten zoals flavonoïden, chlorofyl, proline en flavonolen.^{49,50} Bij appels waarbij *MdMYB10* tot overexpressie werd gebracht veranderde de hoeveelheid van verschillende anthocyanen, maar veranderden ook de hoeveelheden flavonolen, proanthocyanidines, fructose, glucose, sucrose en β -caroteen.⁴⁷ Het is daarnaast niet uitgesloten dat het MBW eiwitcomplex waar MdMYB10 deel van uitmaakt andere processen reguleert.

De MdMYB10 sequentie is afkomstig van het appelras 'Red Field'. Eventuele veranderingen in de gg-appelbomen die door een verhoogde expressie van *MdMYB10* worden veroorzaakt, zullen naar verwachting overeenkomen met de 'Red Field' appelbomen. Ook wanneer de expressie van *MdMYB10* in de gg-appelbomen hoger is dan die van de 'Red Field' appelbomen is er geen aanleiding om te verwachten dat dit tot milieurisico's zou kunnen leiden.

De COGEM is gezien het bovenstaande van mening dat de kans dat de gg-appelbomen een milieurisico veroorzaken verwaarloosbaar klein is.

8.5 Aanwezigheid van T-DNA borders veroorzaakt geen milieurisico

In de gg-appelbomen zijn T-DNA borders aanwezig die afkomstig zijn van *A. tumefaciens* en noodzakelijk zijn voor de transformatie. De COGEM heeft eerder geconcludeerd dat het zeer onwaarschijnlijk is dat de insertie van korte DNA fragmenten, zoals een T-DNA border, tot milieurisico's leidt.⁵⁵

8.6 Mogelijke aanwezigheid van backbone sequenties in appelbomen vormt geen milieurisico

Op basis van de aangeleverde gegevens kan niet uitgesloten worden dat de gg-appelbomen sequenties bevatten die afkomstig zijn van de backbone van de vector. Op de backbone van de vector zijn verschillende sequenties gelegen die een functie vervullen bij de vermeerdering van het plasmide in bacteriën, i.e. RK2 of *oriV*, *ColE1* en *trfA*.^{56,57} De COGEM is van mening dat er geen aanleiding is om te veronderstellen dat deze sequenties een milieurisico zullen veroorzaken.

Daarnaast bevat de backbone het *nptIII* antibioticumresistentiegen. Dit bacteriële gen codeert voor een aminoglycoside-3'phosphotransferase en geeft resistentie tegen verschillende antibiotica uit de groep van de aminoglycosides, zoals kanamycine en neomycine.⁵⁸ De COGEM heeft eerder geconcludeerd dat de aanwezigheid van het *nptIII* antibioticumresistentiegen bij veldproeven geen onaanvaardbaar milieurisico veroorzaakt.⁵⁹ De kans op horizontale overdracht (tussen gg-plant en bacterie) van de betreffende antibioticumresistentiegenen acht de COGEM zeer gering, omdat deze alleen onder bijzondere laboratoriumomstandigheden, maar nog nooit in de praktijk is waargenomen. Daarnaast komt het *nptIII* gen veelvuldig in het milieu voor. De zeer geringe (theoretische) kans op een eventuele genoverdracht van plant op bacterie zal daarom niet leiden tot extra milieurisico.

9. Conclusie

De vergunningaanvraag voldoet aan de vereisten voor een categorie 2 veldproef. De COGEM is van mening dat de in de gg-appelbomen ingebrachte MdMYB10 expressiecassette niet tot een milieurisico zal leiden. Ook de eventuele aanwezigheid van sequenties die op de backbone van de vector zijn gelegen zullen naar verwachting geen milieurisico kunnen veroorzaken.

De COGEM acht de risico's voor mens en milieu van de in de vergunningaanvraag beschreven categorie 2 veldproef met de MdMYB10(R6) gg-appelbomen verwaarloosbaar klein.

10. Aanvullende opmerking

Op basis van de door de aanvrager aangeleverde gegevens kan niet uitgesloten worden dat de gg-appelbomen fragmenten van het *nptIII* gen bevatten. De eventuele aanwezigheid van *nptIII* fragmenten vormt geen milieurisico. De COGEM signaleerde eerder dat de aanwezigheid van antibioticumresistentiegenen uit het oogpunt van risicoperceptie onwenselijk kan worden geacht.⁵⁹ Mede gezien de maatschappelijke discussie omtrent de aanwezigheid van antibioticumresistentiegenen in gg-planten is de COGEM van mening dat de conclusie van de aanvrager over de afwezigheid van het *nptIII* gen van een goede onderbouwing zou moeten zijn voorzien. De COGEM signaleert dat het vanwege het bovenstaande wenselijk kan zijn om de aanvrager te vragen om aanvullende gegevens waaruit blijkt of de gg-appelbomen wel of geen *nptIII* fragmenten bevatten.

Referenties

1. COGEM (2010). Veldproef met genetisch gemodificeerde schurftresistente appelbomen. COGEM advies CGM/101214-01
2. COGEM (1998). BGGO 98-06 Oculatie van genetisch gemodificeerde schimmelresistente appel (*Malus pumila*). COGEM advies CGM/980629-06
3. COGEM (2000). BGGO 00/04 Toetsing van genetisch gemodificeerde appelbomen met verhoogde schimmelresistentie in het veld. COGEM advies CGM/000721-03
4. COGEM (2003). Ontwerpbeschikking BGGO 02/03 Toetsing van genetisch gemodificeerde niet-bloeiende appelbomen met verhoogde schimmelresistentie in het veld. COGEM advies CGM/030127-05
5. COGEM (2003). Oculatie van genetisch gemodificeerde, schimmelresistente, appel. COGEM advies CGM/031124-03
6. COGEM (2004). Veldproef met genetisch gemodificeerde niet-bloeiende appelbomen met verhoogde schimmelresistentie. COGEM advies CGM/041123-01
7. COGEM (2002). Staande landbouw en klassieke veredeling als referentiekader. COGEM advies CGM/021017-06
8. COGEM (2008). Aanpassing van advies over de indeling van veldwerkzaamheden met genetisch gemodificeerde planten. COGEM advies CGM/081125-02
9. Mabblerley DJ *et al.* (2001). The name of the apple. *Teloepa*. 9(2): 421-430
10. Qian G-Z *et al.* (2010). (1933) Proposal to conserve the name *Malus domestica* against *M. pumila*, *M. communis*, *M. frutescens*, and *Pyrus dioica* (*Rosaceae*). *Taxon*. 59(2): 650-652

11. Van der Meijden R (2005). Heukels' flora van Nederland, 23e druk, Wolters-Noordhoff, Groningen
12. Velasco R *et al.* (2010). The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Nat Genet.* 42(10): 833-839
13. Crop Protection Compendium (2007). Apple. CD-ROM edition, © Cab International 2007, Nosworthy way, Wallingford, UK
14. Orange Pippin Fruit Trees. Self-fertile apple varieties. www.orangepippintrees.com/search.aspx?ps=34 (bezoekt: 2 oktober 2015)
15. Vragen & antwoorden: bomen. www.neerlandstuin.nl/v_a/vabomen3.html (bezoekt: 28 oktober 2015)
16. Acquaah G (2007). Principles of plant genetics and breeding. Blackwell publishing. ISBN-10:1-4051-3646-4
17. McDonald MB & Kwong FY Ed. (2005). Flower seeds: biology and technology. CABI Publishing ISBN 0-85199-906-9
18. Wertheim SJ (1968). Nieuwe inzichten in de bestuiving van appel en peer. *Mededelingen van de Directie Tuinbouw.* 31: 438-447
19. Reim S *et al.* (2006). Assessing gene flow in apple using a descendant of *Malus sieversii* var. *sieversii* f. *niedzwetzkiana* as an identifier for pollen dispersal. *Environ Biosafety Res.* 5: 89-104
20. Weeda EJ *et al.* (1987). Nederlandse Oecologische Flora. Wilde planten en hun relaties 2. KNNV Uitgeverij/IVN ISBN 90-5011-180-7
21. Williams RR & Smith BD (1967). VII. Observations on factors influencing the effective distance of pollinator trees in 1966 *Ann. Rpt. Long Ashton Agr and Hort Res Sta.* 1966 126-134
22. Kron P *et al.* (2001). Across- and along-row pollen dispersal in high-density apple orchards: insights from allozyme markers. *J Hortic Sci Biotech.* 76(3): 286-294
23. Soejima J (2007). Estimation of gene flow via pollen spread for the orchard layout prior to the field release of apple transformants. *Acta Hort.* 738: 341-344
24. Tyson RC *et al.* (2011). A mechanistic model to predict transgenic seed contamination in bee-pollinated crops validated in an apple orchard. *Ecol. Modell.* 222: 2084-2092
25. Søndergaard Larsen A & Dahl Kjær E (2009). Pollen mediated gene flow in a native population of *Malus sylvestris* and its implications for contemporary gene conservation management. *Conserv Genet.* 10: 1627-1646
26. De Groot GA *et al.* (2015). De bijdrage van (wilde)bestuivers aan de opbrengst van appels en blauwe bessen. *Alterra-rapport 2636*
27. Van der Ham RWJM *et al.* (1999). Pollenanalyse – stuifmeelonderzoek van honing voor imkers, scholen en laboratoria. Uitgave Stichting Landelijk Proefbedrijf voor Insektenbestuiving en Bijenhouderij Ambrosiushoeve, Hilvarenbeek
28. Coart E *et al.* (2003). Genetic variation in the endangered wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) in Belgium as revealed by amplified fragment length polymorphism and microsatellite markers. *Mol Ecol.* 12: 845-857
29. Coart E *et al.* (2006). Chloroplast diversity in the genus *Malus*: new insights into the relationship between the European wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) and the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh.) *Mol Ecol.* 15: 2171-2182

30. Sierappels (Malus). www.mwiarda.nl/appeltern/sierappel.doc (bezocht: 13 oktober 2015)
31. Kwekerij Roovershof – Sierappel (*Malus x zumi* Golden Hornet) www.roovershof.nl/Roovers/sierappel-malus-zumi-golden-hornet.html (bezocht: 13 oktober 2015)
32. Sestras RE *et al.* (2010). The variability of juvenile period, fruits size and response to diseases attack on F1 interspecific apple hybrids and the efficiency of selection. *Not Bot Hort Agrobot Cluj*. 38(1): 234-240
33. Koopman WJM *et al.* (2007). Linked vs. unlinked markers: multilocus microsatellite haplotype-sharing as a tool to estimate gene flow and introgression. *Mol Ecol*. 16: 243-256
34. Flora van Nederland – wilde planten en hun omgeving online. Appel – *Malus sylvestris*. www.floravannederland.nl/planten/appel/#3 (bezocht: 12 oktober 2015)
35. Larsen AD *et al.* (2006). Hybridization and genetic variation in Danish populations of European crab apple (*Malus sylvestris*). *Tree Genet Genomes* 2: 86-97
36. Cornille A *et al.* (2015). Anthropogenic and natural drivers of gene flow in a temperate wild fruit tree: a basis for conservation and breeding programs in apples. *Evol Appl*. 8: 373-384
37. Cornille A *et al.* (2012). New insight into the history of domesticated apple: secondary contribution of the European wild apple to the genome of cultivated varieties. *PLoS Genet*. 8(5) e1002703 1-13
38. Faunafonds Maatregelen – Fruit- Appels en peren. www.faunafonds.nl/index.asp?p=217 (bezocht: 22 november 2010)
39. Koes R *et al.* (2005). Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci*. 10(5): 236-242
40. Quattrocchio F *et al.* (2006). PH4 of Petunia is a R2R3 MYB protein that activates vacuolar acidification through interactions with basic-helix-loop-helix transcription factors of the anthocyanin pathway. *Plant Cell*. 18: 1274-1291
41. Xie R *et al.* (2011). Anthocyanin biosynthesis in fruit tree crops: genes and their regulation. *African J Biotechnol*. Vol 10(86): 19890-19897
42. El-Sharkawy I *et al.* (2015). Transcriptome analysis of an apple (*Malus x domestica*) yellow fruit somatic mutation identifies a gene network module highly associated with antocyanin and epigenetic regulation. *J Exp Bot*. doi: 10.1093/jxb/erv433
43. Boldt JK *et al.* (2014). Foliar anthocyanins: a horticultural review. Chapter 4. *Horticultural reviews*, Volume 42, Ed. Janick J Wiley-Blackwell published by Wiley J & Sons Inc.
44. Lin-Wang K *et al.* (2011). High temperature reduces apple fruit colour via modulation of the anthocyanin regulatory complex. *Plant Cell Environ*. 34: 1176-1190
45. Butelli E *et al.* (2008). Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nat Biotechnol* 26(11): 1301-1308
46. Espley RV *et al.* (2007). Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10. *Plant J*. 49: 414-427
47. Espley RV *et al.* (2013). Analysis of genetically modified red fleshed apples reveals effects on growth and consumer attributes. *Plant Biotechnol J*. 11: 408-419
48. Espley RV *et al.* (2014). Dietary flavonoids from modified apple reduce inflammation markers and modulate gut microbiota in mice. *J Nutr*. 144: 146-154

49. Gao JJ *et al.* (2011). Forced expression of *Mdmyb10*, a myb transcription factor gene from apple, enhances tolerance to osmotic stress in transgenic *Arabidopsis*. *Mol Biol Rep.* 38: 205-211
50. Onkokesung *et al.* (2014). Modulation of flavonoid metabolites in *Arabidopsis thaliana* through overexpression of the MYB75 transcription factor: role of kaempferol-3,7-dirhamnoside in resistance to the specialist insect herbivore *Pieris brassicae*. *J Exp Bot.* 65: 2204-2217
51. Espley RV *et al.* (2009). Multiple repeats of a promoter segment causes transcription factor autoregulation in red apples. *Plant Cell.* 21: 168-183
52. Miranda A *et al.* (1992). *Agrobacterium tumefaciens* transfers extremely long T-DNAs by a unidirectional mechanism. *J. Bacteriol.* 174(7): 2288-2297
53. Bodor P *et al.* (2008). Metaxenia in apples cv. 'Rewena', 'Relinda', 'Baujade' as influenced by scab resistant pollinizers. *Int J Hort Sci.* 14 (3): 11-14
54. Militaru M *et al.* (2015). Effect of metaxenia on the fruit quality of scab resistant apple varieties. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 6: 151-156
55. COGEM (2008). Cisgenese en voedselveiligheidsbeoordeling. COGEM signalering CGM/081028-04
56. Thomas CM (1984). Genetic evidence for the direction of transcription of the *trfA* gene of broad host range plasmid RK2. *J Gen Microbiol.* 130: 1641-1650
57. Grabherr R & Bayer K (2002). Impact of targeted vector design on *ColE1* plasmid replication. *Trends Biotechnol.* 20(6): 257-260
58. EFSA (2004). Opinion of the scientific panel on genetically modified organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants (Question N° EFSA-Q-2003-109). *The EFSA Journal* 48: 1-18
59. COGEM (2007). Gebruik van antibioticumresistentiegenen in genetische gemodificeerde gewassen voor veldproeven. COGEM advies CGM/070703-01