



**Informatie voor de burger betreffende de doelbewuste
introductie van genetisch gewijzigde suikerbieten.**

Kennisgever

SES EUROPE N.V.
Soldatenplein Z2, n°15
3300 Tienen

Tel : 016/80 83 81
Fax : 016/80 82 63

Titel van de proef

Validatie van een concept voor een virusresistentie van lange duur (rhizomanie virus
BNYVV: beet necrotic yellow vein virus): veldproef met suikerbieten genetisch
gewijzigd om weerstand te bieden aan het rhizomanie virus.

Europees Notificatie nummer

B/BE/02/V3

INHOUDSTAFEL

1. BESCHRIJVING VAN DE GENETISCH GEWIJZIGDE PLANTEN

2. DOEL VAN DE PROEFNEMING

3. OVERZICHT VAN VOORGAANDE EN TOEKOMSTIGE WERKZAAMHEDEN

4. VOORDELEN VOOR HET MILIEU, DE LANDBOUWER OF DE CONSUMENT

5. BIOLOGIE EN LEVENSCYCLUS VAN DE GEBRUIKTE PLANT

6. MOGELIJKE EFFECTEN OF RISICO'S VOOR HET MILIEU

6.1. Uitkruising en verspreiding in natuurlijke ecosystemen

6.1.1. Verspreiding van het transgen via stuifmeel.

6.1.2. Verspreiding van het transgen via zaad.

6.1.3. Selectief voordeel.

6.1.4. Gewasopslag.

6.2. Interacties met doelorganismen

6.3. Interacties met niet-doelorganismen

6.4. Impact van grootschalig en langtermijn gebruik

7. INPERKINGS-, CONTROLE-EN OPVOLGINGSMAATREGELEN

7.1. Controle op pollen verspreiding

7.2. Controle op de verspreiding van transgene zaden

7.3. Controle van gewasopslag

8. Vernietiging van transgeen materiaal

9. NOODSITUATIES

10. INSPECTIE

11. ACTIVITEITENVERSLAG

12. SOCIAAL-ECONOMISCHE ASPECTEN

13. REFERENTIELIJST

14. VERKLARENDE WOORDENLIJST

1. Beschrijving van de genetisch gewijzigde planten

Suikerbiet (*Beta vulgaris*) behoort tot de familie der *Chenopodiaceae*. Deze plant geteeld om zijn suikerrijke wortel is een der belangrijkste gewassen in Oost- en West-Europa. Suikerbiet is een belangrijk bestanddeel van de wisselbouw in de landbouw en levert een aanzienlijke bijdrage aan het inkomen van de landbouwers.

De suikerbieten, beschreven in dit project werden genetisch gewijzigd om weerstand te bieden aan het Rhizomanie virus, een virusziekte veroorzaakt door een furovirus (BNYVV: beet necrotic yellow vein virus) (Tamada en Baba, 1973; Kuszala en Putz, 1977), dat door *Polymyxa betae*, een bodemschimmel, naar de suikerbietwortel wordt overgebracht (Keskin, 1964).

De suikerbieten bevatten tevens het synthetisch *pat* gen (Wohlleben *et al.*, 1988) dat resistentie verleent tegen het herbicide glufosinaat. Dit gen werd gebruikt als selectie merker tijdens de transformatie en de *in vitro* selectie van de planten.

Het belang van de rhizomanie.

De rhizomanie van de suikerbiet is heden ten dage het belangrijkste gezondheidsprobleem van de suikerbieteelt in de wereld (Valentin *et al.*, 1995). Na voor het eerst vastgesteld te zijn in Italië, heeft de ziekte zich zeer snel verspreid in verscheidene Europese landen waaronder Frankrijk, Duitsland, Oost-Europa, en onlangs ook in Engeland, Nederland en België (Asher, 1993).

Gelijktijdig met haar verspreiding in Europa, werd ze tevens zo wat overal ter wereld vastgesteld, bijvoorbeeld in Japan (Tamada *et al.*, 1971), in de Verenigde Staten (Duffus *et al.*, 1984) en in China (Gao *et al.*, 1983).

De opbrengst van 60 tot 70 ton wortels per hectare in gezonde gebieden, kan terugvallen tot 20 ton in percelen besmet met het virus. Gelijktijdig, zakt het normale suikergehalte van 16-17% tot ongeveer 8%.

Bovendien, leidt een verhoogde concentratie van Na⁺ en K⁺ ionen tot een daling van de sapzuiverheid, hetgeen een belangrijke daling van de opbrengst van de suikerextractie en de rentabiliteit van de suikerindustrie tot gevolg heeft (Valentin *et al.*, 1995).

Biologie van het virus.

Het BNYVV virus is samengesteld uit vijf ribonucleoproteïne partikels, die elk een enkelstrengig RNA bevatten die voor de specifieke functies van het virus coderen. Het RNA 1 en 2 zijn vereist voor de replicatie van het viraal RNA, de opbouw, de beweging en de overdracht van het virus. De RNA 3, 4 en 5 zijn noodzakelijk voor de ontwikkeling van de ziekte in de biet en zijn cyclus in de overdragende schimmel *Polymyxa betae* (Richards en Tamada, 1992; Tamada, 1999).

Het merendeel van de virusstammen kan door moleculaire analyse onderverdeeld worden in twee hoofdgroepen: type A en B. Het BNYVV virus van type A vindt men terug in de meeste Europese landen waaronder België, in de Verenigde Staten, in China en Japan. Het BNYVV virus van het type B wordt waargenomen in Duitsland en in Frankrijk. Deze twee pathotypes vertonen een nucleotide sekwentie met een homologie van 97%.

Sommige BNYVV virusstammen die in Japan en Frankrijk gevonden werden bevatten een vijfde RNA, RNA 5, dat codeert voor een proteïne dat verwant is aan dat van RNA 3 en betrokken is bij de symptomatologie van de ziekte in suikerbiet (Koenig *et al.*, 1997; Kiguchi *et al.*, 1996). Inoculatie testen met het BNYVV virus met dit vijfde RNA, veroorzaken in suikerbiet veel ernstigere symptomen van de ziekte dan de stammen die dit RNA niet bevatten (Tamada *et al.*, 1996).

Deze zeer agressieve stam met het RNA 5, ook pathotype P genoemd, is aanwezig in Frankrijk in de streek van Pithiviers.

Genetische strategie ontwikkeld in het project.

Zoals bij andere furovirussen, wordt de cel tot cel beweging van het virus geregeld door drie genen gelegen op het RNA 2. Ze vormen een groep of “cluster” beter gekend als het “triple gene block” (TGB) (Gilmer *et al.*, 1992) dat codeert voor drie virale proteïnen die respectievelijk naar hun moleculaire massa P42, P13 en P15 genoemd werden. Zij zijn betrokken in de vorming van een specifiek complex dat onontbeerlijk is voor de cel tot cel beweging van het virus.

De strategie in dit project bestaat erin een plant resistent te maken tegen het BNYVV virus, door de cel tot cel beweging te verhinderen. Om dit te verwezenlijken werd een gen van het “triple gene block”, noodzakelijk voor de beweging van het virus, het P15 gen, geïsoleerd en gewijzigd zodat zijn uitdrukking in de plant de cel tot cel beweging zou verstoren en verhinderen (Lauber *et al.*, 2001).

Ten einde ondoeltreffend te zijn in het virus, werd het gen gewijzigd zodat het proteïne waarvoor het codeert verschillend zou zijn van het normaal, door het virus gecodeerde proteïne, en dus niet functioneel is.

Rekening houdend met het bewegingsmechanisme aangewend door de proteïnen van de TGB sekwentie, kan men veronderstellen dat de uitdrukking in de plant van de gewijzigde sekwentie aanleiding geeft tot een proteïne dat in competitie treedt met het virale proteïne voor de vorming van een complex met de andere TGB proteïnen of met andere sites of bestanddelen van de cel.

2. Doel van de proefneming

In de experimentele transformanten beschreven in dit document, wordt een sekwentie uitgedrukt die overstemt met een gewijzigd P15 proteïne van het BNYVV virus.

De veldproef aangevraagd voor het seizoen 2002 is onontbeerlijk om in natuurlijke agronomische condities vast te stellen of:

- (1) het verwachte mechanisme leidt tot een snelle blokkering van de virusvermenigvuldiging en zijn verspreiding doorheen de bietwortel in normale infectie condities;
- (2) de constitutieve uitdrukking van de gewijzigde P15 sekwentie in suikerbiet een resistentie oplevert gedurende het groeiseizoen;
- (3) de uitdrukking van deze sekwentie de normale wortelopbrengst herstelt.

3. Overzicht van voorgaande en toekomstige werkzaamheden

Gebruik van resistentie bronnen afkomstig van het genus Beta.

Aangezien er geen doeltreffende methode voorhanden is om op grote schaal de verspreiding van het rhizomanie met chemische of fysische middelen te controleren (Henry *et al.*, 1992) hebben de inspanningen zich gericht op de genetische resistentie bronnen afkomstig van het geslacht *Beta vulgaris*. Verscheidene genen die een tolerantie opleveren tegen het virus werden geïdentificeerd, waarvan sommige met succes worden gebruikt door de suikerbiet veredelaars.

Sinds 1986, verschenen er op de franse markt variëteiten tolerant aan het rhizomanie, waarbij de suikerbietteelt gered werd in geïnfecteerde gebieden die bereid waren deze cultuur op te geven. Deze variëteiten vertegenwoordigden 23% van de verkoop van suikerbietzaad in 1999 en de toename blijft stijgen aangezien deze variëteiten 32% van de verkoop van suikerbietzaad uitmaakten in 2000 (La Technique betteravière, 1999). In België, werden de eerste tolerante variëteiten gecommmercialiseerd in 1998 en hebben ze 2% van de verkoop van suikerbietzaad vertegenwoordigd in 2001.

Er bestaan verschillende resistentiebronnen tegen het rhizomanie afkomstig van het genus *Beta* (Whitney, 1989). Niettemin, zijn er slechts weinig studies die aangeven dat de tolerantiegenen die heden ten dage gebruikt worden betrokken zijn bij verschillende resistentiemechanismen.

De snelle toename van de ziekte in de cultuurgebieden van suikerbiet en de ontdekking van zeer agressieve BNYVV stammen (b.v.: het pathotype P), tonen aan dat er een zekere belangstelling bestaat om afwisseling te brengen in de stammen en de resistentiemechanismen om uiteindelijk een lange duur resistentie tegen het virus te bekomen hetzij door ze afzonderlijk, hetzij door ze in combinatie te gebruiken.

Ontwikkeling van genetische modificatietechnieken in de strategie van toegepaste virusresistentie voor suikerbiet.

Sinds 1986, beschreven verscheidene publicaties het gebruik van virale genskwenties om planten een hoog resistentie niveau tegen virussen te bezorgen (Powell *et al.*, 1986; Fritchen en Beachy, 1993; Wilson, 1993). Een veel beschreven strategie betreft het gebruik van de genskwentie die codeert voor het manteleiwit van het beoogde virus (CP of “coat protein”), dat door middel van de gepaste regulatie sekwenties wordt uitgedrukt in de plant.

Voor suikerbiet werd de uitdrukking van de sekwentie coderend voor het manteleiwit van het BNYVV virus beschreven door Kallerhof *et al.*, 1990, Ehlers, 1991, Kraus *et al.*, 1994 en in het octrooi WO91/13159. Deze rapporten vermelden slechts weinig gegevens betreffende het resistentie niveau dat bekomen wordt wanneer de suikerbieten geteelt worden in met rhizomanie geïnfecteerde grond. Bovendien, laat de gepubliceerde informatie niet toe te besluiten dat het resistentie mechanisme dat door dit type van sekwentie bekomen wordt een volledige resistentie tegen het BNYVV oplevert voor suikerbiet.

Het dossier B/BE/02/V3 beschrijft een nieuwe resistentie strategie tegen rhizomanie, door het in suikerbiet inbrengen van sekwenties afkomstig van het BNYVV die zodanig gewijzigd werden dat ze niet meer functioneel zijn voor het virus maar toch een hoog resistentie niveau tegen een virale infectie opleveren.

Strategie ontwikkeld in dit project.

Het BNYVV virus heeft vier (of vijf) RNA's. RNA 1 en 2 zijn noodzakelijk voor de replicatie van het viraal RNA, de beweging en de overdracht van de virus. De RNA 3, 4 en 5 zijn noodzakelijk voor de ontwikkeling van de ziekte in de biet en zijn cyclus in de overdragende schimmel *Polymyxa betae* (Richards en Tamada, 1992; Tamada, 1999).

Zoals bij andere furovirussen, wordt de cel tot cel beweging van het virus geregeld door drie genen gelegen op het RNA 2. Ze vormen een groep of “cluster” beter gekend als het “triple gene block” (TGB) (Gilmer *et al.*, 1992) dat codeert voor drie virale proteïnen die respectievelijk naar hun moleculaire massa P42, P13 en P15 genoemd werden. Zij zijn betrokken in de vorming van een specifiek complex dat onontbeerlijk is voor de cel tot cel beweging van het virus.

De strategie in dit project bestaat erin een plant resistent te maken tegen het BNYVV virus, door de cel tot cel beweging te verhinderen. Om dit te verwezenlijken werd een gen van het “triple gene block”, noodzakelijk voor de beweging van het virus, het P15 gen, geïsoleerd en gewijzigd zodat zijn uitdrukking in de plant de cel tot cel beweging zou verstoren en verhinderen (Lauber *et al.*, 2001).

Transgene planten die een dergelijk gewijzigd gen, coderend voor een van de TGB proteïnen, uitdrukken, hebben een resistentie ontwikkeld tegen het desbetreffende virus. Dit is het geval voor het mozaïekvirus van witte klaver (WCIMV) en het virus X van aardappel (PVX) (Beck *et al.*, 1994; Seppänen *et al.*, 1997).

Ten einde ondoeltreffend te zijn in het virus, werd het gen gewijzigd zodat het proteïne waarvoor het codeert verschilt van het origineel viraal proteïne en hierdoor niet meer functioneel is.

De gewijzigde P15 sekwentie werd via transformatie in het genoom van suikerbiet geïntegreerd. De bekomen primaire transformanten werden in rhizomanie geïnfecteerde grond opgekweekt in de kultuurkamer, waarna op het einde van het experiment het infectie niveau van het virus in de wortel werd gemeten. In deze biotoetsen, uitgevoerd in gecontroleerde omstandigheden, bleken sommige transformanten zeer resistent te zijn tegen een BNYVV infectie (Lauber *et al.*, 2001).

Rekening houdend met het bewegingsmechanisme aangewend door de proteïnen van de TGB sekwentie, kan men veronderstellen dat de uitdrukking in de plant van de gewijzigde sekwentie aanleiding geeft tot een proteïne dat in competitie treedt met het virale proteïne voor de vorming van een complex met de andere TGB proteïnen of met andere sites of bestanddelen van de cel.

Het volledige concept werd beschreven in de octrooien WO98/07875 en WO00/03025.

In 2001 werden hybriden van de eerste generatie van de meest resistente primaire transformanten op het veld getest in Frankrijk (toelating B/FR/01/02/02).

Dit experiment dient herhaald te worden ten einde in verschillende agronomische omstandigheden na te gaan dat de twee geselecteerde transformanten aan de hybriden en de lijnen die hiervan afstammen de resistentie tegen het BNYVV verlenen gedurende het groeiseizoen.

Twee proeven zijn voorzien in 2002, een eerste in Frankrijk onder de toelating B/FR/01/02/02 en een tweede in België in het kader van het dossier B/BE/02/V3.

4. Voordelen voor het milieu, de landbouwer of de consument

De rhizomanie van de suikerbiet is heden ten dage het belangrijkste gezondheidsprobleem van de suikerbieteelt in de wereld (Valentin *et al.*, 1995). De opbrengst van 60 tot 70 ton wortels per hectare in gezonde gebieden, kan terugvallen tot 20 ton in percelen besmet met het virus. Gelijktijdig, zakt het normale suikergehalte van 16-17% tot ongeveer 8%.

Bovendien, leidt een verhoogde concentratie van Na⁺ en K⁺ ionen tot een daling van de sapzuiverheid, hetgeen een belangrijke daling van de opbrengst van de suikerextractie en de rentabiliteit van de suikerindustrie tot gevolg heeft (Valentin *et al.*, 1995).

De ernst van deze ziekte is grotendeels te wijten aan zijn endemisch karakter dat zijn verspreiding in de bodem van de suikerbiet producerende landen met zich meebrengt. Aangezien er geen doeltreffende methode voorhanden is om op grote schaal de verspreiding van het rhizomanie met chemische of fysieke middelen te controleren (Henry *et al.*, 1992) hebben de inspanningen zich gericht op de genetische resistentie bronnen afkomstig van het geslacht *Beta vulgaris*. Verscheidene genen die een tolerantie opleveren tegen het virus werden geïdentificeerd, waarvan sommige met succes worden gebruikt door de suikerbiet veredelaars.

Sinds 1986, verschenen er op de markt variëteiten tolerant aan het rhizomanie, waarbij de suikerbietteelt gered werd in geïnfecteerde gebieden die bereid waren deze cultuur op te geven. Niettemin, zijn er slechts weinig studies die aangeven dat de tolerantiegenen die heden ten dage gebruikt worden betrokken zijn bij verschillende resistentiemechanismen ofschoon ze afkomstig zijn uit verschillende suikerbiet bronnen of wilde bieten (Whitney, 1989).

In verscheidene Europese landen blijft het rhizomanie zich uitbreiden. In Frankrijk is het percentage van de suikerbiet oppervlakte geïnfecteerd door het virus van 39% in 1999 toegenomen tot 46% in 2000. In Nederland werd de aanwezigheid van het rhizomanie in verschillende gebieden gemeld door Heijbroek (Heijbroek, 1984 en Heijbroek, 1989).

In het verleden werd de ziekte in België enkel waargenomen in de streek van Antwerpen (Wauters, 1996) maar sinds 1995, werden infectiebronnen geïdentificeerd in verschillende streken van het land (Wauters *et al.* 1996) en deze toename zal zich hoogstwaarschijnlijk in de komende jaren nog versterken.

In ons land, vertegenwoordigde de verkoop van tolerante variëteiten 2% van de verkoop van suikerbietzaad in 2001.

De snelle toename van de ziekte in de cultuurgebieden van suikerbiet en de recente ontdekking van zeer agressieve BNYVV stammen (b.v.: het pathotype P), tonen aan dat er een zekere belangstelling bestaat om afwisseling te brengen in de resistentiemechanismen om uiteindelijk een lange duur resistentie tegen het virus te bekomen hetzij door ze afzonderlijk, hetzij door ze in combinatie te gebruiken.

5. Biologie en levenscyclus van de gebruikte plant

De geteelde suikerbiet is een tweejarige plant die een vernalisatie periode (lage temperatuur en korte dagen) vereist om de bloei te induceren. De verlenging van de dagen, in de lente, leidt tot de vorming van de bloeistengel en uiteindelijk na de bevruchting tot de zaadproductie (Cooke en Scott, 1992).

In normale kultuuromstandigheden, blijven de suikerbieten geteelt voor hun wortel in een vegetatief stadium; ze bloeien niet en vormen geen zaad.

Zo ook, zullen de suikerbieten die deel uitmaken van de veldproef in het kader van het dossier B/BE/02/V3 in een vegetatief stadium blijven tijdens het seizoen 2002. Ze zullen geoogst worden in september 2002, voor de vernalisatie periode en de bloeiinductie.

6. Mogelijke effecten of risico's voor het milieu

6.1. Uitkruising en verspreiding in natuurlijke ecosystemen

6.1.1. Verspreiding van het transgen via stuifmeel.

Zoals voor iedere wortelcultuur van suikerbiet, zullen de planten van de proef niet kunnen bloeien. Er zal dus geen verspreiding zijn van stuifmeel.

Het risico van overdracht van genetisch materiaal naar andere sexueel compatibele soorten wordt als nihil beschouwd.

6.1.2. Verspreiding van het transgen via zaad.

De planten van de proef zullen het volledige seizoen in hun vegetatieve toestand blijven. Een toezichtsplan is voorzien om iedere plant die zou doorschieten op te sporen vooraleer ze zou bloeien.

Het verspreidingsrisico van de transgenen via zaad wordt dus als nihil beschouwd.

6.1.3. Selectief voordeel.

Het is zeer onwaarschijnlijk dat de genetische wijziging het overlevingspotentiaal van de suikerbiet in het leefmilieu of zijn verspreidingscapaciteit verandert, afgezien van zijn resistentie tegen het BNYVV virus en het herbicide glufosinaat.

6.1.4. Gewasopslag.

Op het einde van de proef zullen de suikerbieten mechanisch geoogst worden: de planten van ieder perceel zullen onttopt, geroid, gewassen en gewogen worden. Ze zullen vervolgens versneden worden en pulpstalen als weergave van de bietplanten van ieder perceel zullen genomen worden en in gesloten bakjes verzameld worden. Deze bewerkingen zullen op het proefveld gebeuren door middel van een mobiele werkplaats die door Advanta gebruikt wordt voor het oogsten en het bemonsteren van haar opbrengstpercelen.

De pulpstalen zullen ingevroren en verstuurd worden naar het laboratorium van SES Europe, Tienen, om de lopende analyses uit te voeren die toelaten het opbrengspotentieel van suikerbiethybriden te bepalen.

Bij de oogst zal men het bladmateriaal, de toppen en de wortelstukken op het proefveld laten liggen om ze vervolgens mechanisch onder de grond te stoppen.

De experimentele site zal gedurende twee jaar na de proef niet meer gebruikt worden om suikerbieten te telen. De enige op de experimentele site toegelaten gewassen zijn deze die beroep doen op letale herbiciden voor suikerbiet.

6.2. Interacties met doelorganismen

Het is zeer onwaarschijnlijk dat de genetische wijziging een ecologische weerslag zal hebben op het BNYVV virus.

Inderdaad, de strategie die in dit project gevolgd wordt bestaat erin een plant resistent te maken tegen het BNYVV virus, door de cel tot cel beweging te verhinderen. Om dit te verwezenlijken werd een gen van het “triple gene block”, noodzakelijk voor de beweging van het virus, het P15 gen, geïsoleerd en gewijzigd zodat zijn uitdrukking in de plant de cel tot cel beweging zou verstoren en verhinderen (Lauber *et al.*, 2001).

Er wordt verondersteld dat het niet functionele proteïne in competitie treedt met het virale P15 proteïne voor de vorming van een complex met andere virale proteïnen van het TGB of met zekere cellulaire bestanddelen.

De gewijzigde P15 sekwentie ingebracht in suikerbiet, levert een sterke resistentie op tegen het BNYVV virus door het translocatiemechanisme van het virus in de plant en meer bepaald in de wortel te blokkeren.

6.3. Interacties met niet-doelorganismen

Er wordt geen enkele interactie met andere organismen verwacht met enige invloed op het leefmilieu verschillend van diegene die verbonden zijn aan iedere proefneming met niet gewijzigde suikerbieten.

Het globale risico voor het leefmilieu, verbonden met de uitvoering van deze proef, wordt als nihil beschouwd.

6.4. Impact van grootschalig en langtermijn gebruik

De transformanten beschreven in het dossier B/BE/02/V3 worden uitsluitend in een experimentele context gebruikt. Ze werden ontwikkeld om de doeltreffendheid van de gewijzigde P15 sekwentie van het BNYVV virus te testen om suikerbiet resistent te maken tegen deze virus.

Het P15 gen van het BNYVV virus werd gewijzigd zodat het proteïne waarvoor het codeert zou verschillen van het virale proteïne en aldus niet functioneel zou zijn voor het virus.

Het is zeer onwaarschijnlijk dat de genetische wijziging een ecologische weerslag zal hebben op het BNYVV virus.

7. Inperkings-, controle-en opvolgingsmaatregelen

Een uitvoerig protocol zal opgesteld worden vooraleer het experiment opgestart wordt en zal medegedeeld worden aan de technisch verantwoordelijke belast met de proef.

Dit protocol zal een beschrijving bevatten van alle handelingen die moeten verricht worden in de percelen, het nemen van nota's en stalen, en de specifieke maatregelen betreffende een experiment in open lucht met genetisch gewijzigde suikerbieten.

De technische ploeg belast met de verwezenlijking van de proef zal beschikken over een logboek om alle handelingen uitgevoerd in de percelen te noteren en te laten valideren door de technisch verantwoordelijke.

7.1. Controle op pollen verspreiding

De proef bestaat erin suikerbieten te telen voor hun wortel. De transgene planten van de proef blijven in een vegetatief stadium.

De proefsite zal wekelijks bezocht worden. Iedere plant die zou doorschieten zal snel opgespoord en vernietigd worden vooraleer ze kan bloeien. Er zal geen verspreiding van stuifmeel optreden.

7.2. Controle op de verspreiding van transgene zaden

Zie 7.1. Er zal geen verspreiding van zaden op de proefsite plaatsvinden.

7.3. Controle van gewasopslag

Bij de oogst zal men het bladmateriaal, de toppen en de wortelstukken op het proefveld laten liggen om ze vervolgens mechanisch onder de grond te stoppen.

De experimentele site zal gedurende twee jaar na de proef niet meer gebruikt worden om suikerbieten te telen. De enige op de experimentele site toegelaten gewassen zijn deze die beroep doen op letale herbiciden voor suikerbiet (bijvoorbeeld: graangewassen).

De proefsite zal gedurende twee jaar na het experiment bezocht worden door bevoegd personeel van Advanta.

Tijdens het experiment en de twee daarop volgende jaren, zal iedere hergroei van suikerbiet dat aan de oppervlakte van de proefsite verschijnt onmiddellijk vernietigd worden.

Indien dit noodzakelijk zou blijken, kan de hergroei van genetisch gewijzigd materiaal op verschillende manieren vastgesteld worden:

- moleculaire analyses van het type “Southern blot” of via PCR op plantmateriaal laat toe om de aanwezigheid van het ingebrachte DNA aan te tonen en de specifieke transformant te identificeren.
- wanneer ze besproeid worden met glufosinaat ammonium zullen de genetisch gewijzigde suikerbieten overleven terwijl de niet gewijzigde suikerbieten zullen afsterven.
- een Elisa test gebruikmakend van een antilichaam gericht tegen het *pat* proteïne (art. 24016E07, FDW, Steffens Biotechnische analysen GmbH, Duitsland) laat toe de aanwezigheid van het proteïne in plantweefsel aan te tonen.
- wanneer ze geteelt worden in een met BNYVV geïnfecteerde grond, moeten de genetisch gewijzigde planten gezond blijven, terwijl de niet gewijzigde planten die gevoelig zijn aan het virus, de typische symptomen van het rhizomanie zullen vertonen.

- bovendien, laat een specifieke Elisa test (Torrance *et al.*, 1996) uitgevoerd op de zijwortels toe om het infectie niveau te bepalen van het BNYVV virus in de wortels. Deze test laat toe om gevoelige en resistente planten van mekaar te onderscheiden. De genetisch gewijzigde planten geteelt in rhizomanie grond moeten duidelijk lagere virus hoeveelheden vertonen dan niet gewijzigde, niet resistente planten geteelt in dezelfde omstandigheden.

De behandeling van de sites, die hierboven niet expliciet beschreven werden, zullen conform zijn aan de klassieke technieken zoals ze toegepast worden in de suikerbietteelt.

8. Vernietiging van transgeen materiaal

In overeenstemming met de Advanta procedures in verband met proeven in open lucht met genetisch gewijzigde suikerbieten, zal het overschot aan zaad verzameld in de zaaimachine na het zaaien, teruggestuurd worden naar het laboratorium van SES Europe, Tienen om er vernietigd te worden.

De suikerbieten die uitgetrokken worden bij het uitdunnen zullen tussen de percelen achtergelaten worden op de site .

Bij de oogst, met uitzondering van de pulpstalen van de wortels die verpakt worden in gesloten bakjes, ingevroren en verzonden worden naar SES Europe voor de opbrengst analyses, zal al het plant materiaal afkomstig van de proefplanten (bladmateriaal, toppen en wortelstukken) en het afvalwater na het wassen van de wortels, achtergelaten worden op de site en in de grond gestopt worden.

De experimentele site zal gedurende twee jaar na de proef niet meer gebruikt worden om suikerbieten te telen. De enige op de experimentele site toegelaten gewassen zijn deze die beroep doen op letale herbiciden voor suikerbiet (bijvoorbeeld: graangewassen).

9. Noodsituaties

De proefsite zal gedurende de volledige duur van de proef wekelijks bezocht worden door bevoegd personeel van Advanta. Dit zal toelaten te verzekeren dat iedere onvoorziene omstandigheid vroegtijdig zal vastgesteld worden.

De proef is een proef met vegetatieve suikerbieten. Niettemin, zal iedere suikerbiet (transgeen of niet transgeen) die doorschiet opgespoord en uitgetrokken worden vooraleer ze zou bloeien.

Indien nodig, kunnen de proefplanten vernietigd worden door gebruik te maken van een gepast herbicide (bijvoorbeeld: metsulfuron-methyl of glyfosaat).

10. Inspectie

De inspectie-generaal der Grondstoffen en Verwerkte producten is in België belast met de controle van veldproeven met transgene planten. Ten einde haar controles te plannen is de kennisgever verplicht op voorhand de bevoegde dienst te informeren over de zaai- en oogstdatum. Op het terrein waken controleurs erover dat zaai- en oogstbewerkingen overeenstemmend de ministeriële toelating en de verschillende protocols uitgevoerd worden. Daarnaast nemen de controleurs stalen van het plantaardig materiaal die in officiële laboratoria geanalyseerd worden.

11. Activiteitenverslag

Op het einde van het teeltseizoen dient een door de kennisgever opgesteld activiteitenverslag overgemaakt te worden aan de bevoegde dienst, nl. De Inspectie-generaal der Grondstoffen en verwerkte producten en dit uiterlijk op 31/12/2002. Dit activiteitenverslag omvat ten minste de volgende gegevens:

- Een kopie van het logboek
- De plaats en periode van verspreiding
- De precieze aard van de daadwerkelijke verspreide transformanten
- De werkelijke oppervlakte van het proefperceel
- De doelstelling van de proeven
- De frequentie waarmee waarnemingen werden gedaan op het proefperceel en de aard daarvan
- De maatregelen die werden genomen om een onbedoelde verspreiding van transgeen materiaal in het proefperceel te vermijden
- De gebruikte methode ter vernietiging van de oogst en de doeltreffendheid ervan
- De bij de proef bekomen resultaten
- Een overzicht van het toezicht op het proefperceel

12. Sociaal-economische aspecten

In verscheidene Europese landen blijft het rhizomanie zich uitbreiden. In Frankrijk is het percentage van de suikerbiet oppervlakte geïnfecteerd door het virus van 39% in 1999 toegenomen tot 46% in 2000. In Nederland werd de aanwezigheid van het rhizomanie in verschillende gebieden gemeld door Heijbroek (Heijbroek, 1984 en Heijbroek, 1989).

In België werden sinds 1995 infectiebronnen geïdentificeerd in verschillende streken van het land (Wauters *et al.*, 1996) en er wordt verwacht dat in de komende jaren de toename nog zal stijgen zoals het werd vastgesteld in Nederland en Frankrijk.

Aangezien er geen doeltreffende methode voorhanden is om op grote schaal de verspreiding van het rhizomanie met chemische of fysische middelen te controleren (Henry *et al.*, 1992) hebben de inspanningen zich gericht op de genetische resistentie bronnen afkomstig van het geslacht *Beta vulgaris*. Verscheidene genen die een tolerantie opleveren tegen het virus werden geïdentificeerd, waarvan sommige met succes worden gebruikt door de suikerbiet veredelaars.

Sinds 1986, verschenen er op de franse markt variëtiën tolerant aan het rhizomanie, waarbij de suikerbietteelt gered werd in geïnfecteerde gebieden die bereid waren deze cultuur op te geven. Suikerbiet is een belangrijk bestanddeel van de wisselbouw in de landbouw en levert een aanzienlijke bijdrage aan het inkomen van de landbouwers.

Niettemin, zijn er slechts weinig studies die aangeven dat de tolerantiegenen die heden ten dage gebruikt worden betrokken zijn bij verschillende resistentiemechanismen ofschoon ze afkomstig zijn uit verschillende suikerbiet bronnen of wilde bieten (Whitney, 1989).

De snelle toename van de ziekte in de cultuurgebieden van suikerbiet en de recente ontdekking van zeer agressieve BNYVV stammen, tonen aan dat er een zekere belangstelling bestaat om afwisseling te brengen in de resistentiemechanismen om uiteindelijk een lange duur resistentie tegen het virus te bekomen hetzij door ze afzonderlijk, hetzij door ze in combinatie te gebruiken.

13. Referentielijst

- Anonymous 1996 La rhizomanie s'étend à de nouvelles régions. Le sillon Belge N° supplément 19/01/1996, 14-21.
- Asher M. (1993) Rhizomania in the sugar beet crop. ed. D.A. Cooke and R.K. Scott, Chapman & Hall, London, 312-338.
- Beck DL., Van Dolleweerd CJ., Lough T., Balmori E., Andersen M., O'Brien I., and Forster R. (1994) Disruption of virus movement confers broad spectrum resistance against systemic infection by plant viruses with a triple gene block. Proc. Natl Acad Sci USA 91: 10310-10314.
- Bleykasten-Grosshans C., Guilley H., Bouzoubaa S., Richards K., Jonard G. (1997) Independent expression of the first two triple gene block proteins of beet necrotic yellow vein virus complements virus defective in the corresponding gene but expression of the third protein inhibits viral cell-to-cell movement. Mol. Plant-Microbe Interact 10, 240-246.
- Dufus JE., Whitney RC., Larsen RC., Lin H. Lewellen R. (1984) First report in the western hemisphere of rhizomania of sugar beet caused by beet necrotic yellow vein virus. Pl Dis. 68: 251.
- Elhers U. (1991) Cloning of coat protein gene of the beet necrotic yellow vein virus and its expression in sugar beet hairy root . Theoretical and Applied genetic. 81, 777-782.
- Fitch J. and Beachy R. (1993) Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. Ann. Rev. Microbiol. 47, 739-763.
- Gao J., Deng F., Zhai H. , Ling X., Liu H. (1983) The occurrence of beet necrotic yellow vein virus in China. Acta Phytopathol Sin. 13:1-4.
- Gilmer D., Bouzoubaa S., Hehn A., Guilley H. (1992) Efficient cell-to-cell movement of beet necrotic yellow vein virus requires 3' proximal genes located on RNA2. Virology 189, 40-47.
- Heijbroek W. 1984 Distribution of the BNYVV in The Netherlands, Proceedings 1st International conference of Sugar beet virologists, Colmar, 95-96.
- Heijbroek W., 1989. The development of Rhizomania in two areas of the Netherlands and its effect on sugar beet growth quality. Neth. J. Pl. Path. 95, 27-35.

- Henry C., Bell G., Hill S. (1992) The effect of methyl bromide fumigation on rhizomania inoculum in the field. *Plant Pathology*. 41: 483-489.
- Kallerhoff J., Perez P., Bouzoubaa S., Ben Tahar S. (1990) Beet necrotic yellow vein virus coat protein-mediated protection in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) protoplasts. *Plant Cell Report* 9, 224-228.
- Kiguchi T., Saito M., Tamada T. (1996) Nucleotide séquence analysis of RNA-5 of five isolates of beet necrotic yellow vein virus and the identity of a deletion mutant. *J Gen Virol* 77: 575-580.
- Koenig R., Haeberle AM., Commandeur U. (1997) Detection and characterization of a distinct type of beet necrotic yellow vein virus RNA 5 in a sugar beet growing area in Europe. *Arch Virol* 142: 1499-1504.
- Kraus J., Holtschulte B., Mechelke W., Schulte-Kappert E. (1994) Field performance of transgenic sugarbeet plants expressing BNYVV coat protein plants. Fourth Int. Congress of Plant Molecular Biology, Int. Sic. for Plant Molecular Biology, Amsterdam.
- Kuszala M. and Putz C. (1977) La rhizomanie de la betterave sucrière en Alsace;gamme d'hôtes et propriétés biologiques du BNYVV. *Ann.Phytopathology* 9: 435-446.
- Lauber E., Bleykasten-Grosshans C., Erhardt M., Bouzoubaa S., Jonard G., Richards KE. and Guilley H. (1998) Cell-to-cell movement of beet necrotic yellow vein virus I. Heterologous complementation experiments provide evidence for specific interactions among the triple gene block proteins. *Molec Plant-Microbe Interact* 11, 618-625.
- Lauber E., Janssens L., Weyens G., Jonard G., Richards KE., Lefebvre M., Guilley H. (2001) Rapid screening for dominant negative mutations in the beet necrotic yellow vein virus triple gene block proteins P13 and P15 using a viral replicon. *Transgenic research* , 10, August 2001, 293-302
- Powell A., Nelson R., Rogers S., Fraley R. (1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the tomato mosaic virus coat protein gene. *Science* 232, 738-743.
- Richards K., Tamada T. (1992) Mapping functions on the multipartite genome of beet necrotic yellow vein virus *Annual Review of Phytopathology*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30, 291-313.

- Seppänen P., Puska R., Honkanen J., Tyulkina L., Fedorkin O., Morozov S. and Atabekov J. (1997) Movement protein –derived resistance to triple gene block-containing plant viruses. *J. Gen Virol* 78: 1241-1246.
- Tamada T. (1999) Benyviruses. Webster RG, Granoff A (eds) *Encyclopedia of virology*, 2nd ed. Academic Press, New York (in press).
- Tamada T. and Baba T. (1973) Beet necrotic yellow vein virus from rizomania-affected sugar beet in Japan. *Annals of Phytopathological Society of Japan*. Vol 39, 325-332.
- Tamada T., Baba T. and Abe H. (1971) A virus isolated from sugar beet showing ‘rhizomania’ like symptoms and its transmission in soil. *Bull Sugar Beet Research Suppl* 13: 179-186.
- Tamada, T., Kusume, T., Uchino, H., Kiguchi, T. and Saito, M. (1996). Evidence that Beet Necrotic Vein Virus RNA-5 is involved in symptom development of sugar-beet roots. *Proceedings of the third symposium of the international working group on plant viruses with fungal vectors*: 49-52.
- Torrance, L., Pead, M. and Buxton, G. (1988). Production and some characteristics of monoclonal antibodies against beet necrotic yellow vein virus. *Ann. Appl. Biol.* 113, 519-530
- Valentin P., Fonné G., Blech F., Gerst M., Reinbold C., Lemaire O., Merdinoglu D., Merdinoglu S., Putz C. (1995) La rhizomanie de la betterave : état actuel des connaissances *Cahiers Agricultures* 1995; 4: 417-429.
- Wauters A. 1999 Rhizomania le danger existe. *Le betteravier*, Février 1999, 36.
- Wauters A., Maraite H., Steyers S. 1996 Extension de la rhizomanie en Belgique en 1995. *Le Betteravier* N° Février 1996, 48-49.
- Whitney E. (1989) Identification, distribution, and testing for resistance to rhizomania in *Beta maritima*. *Plant Disease* 73, 287-289.
- Wilson T. (1993) Strategies to protect crop plants against viruses – pathogen derived resistance bloccons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3134-3141.
- Wohlleben, W., Arnold W., Broer I., Hilleman D., Strauch E., Pühler A. (1988) Nucleotide sequence of the Phosphinotricin-N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridichromogenes* Tü 494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene* 70, 25-37.

14. Verklarende woordenlijst

BNYVV:	“beet necrotic yellow vein virus”, virus die verantwoordelijk is voor de vergeling en het afsterven van de nerven bij suikerbiet. Deze virus wordt door de bodemschimmel <i>Polymyxa betae</i> naar de suikerbietwortel overgebracht
CP:	coat protein, manteleiwit van de virus
Furovirus:	<i>fungus rod shape virus</i> , virusklasse waartoe plantvirussen behoren. De furovirussen hebben verscheidene RNA partikels.
K ⁺	kalium ion
Na ⁺	natrium ion
P13, P42, P15:	proteïnen betrokken bij de vorming van een specifiek complex dat onontbeerlijk is voor de cel tot cel beweging van het BNYVV virus
RNA:	ribonucleïnezuur
TGB:	<i>triple gene block</i> , geheel van drie genen gelegen op het RNA 2 van het BNYVV virus, betrokken bij de cel tot cel beweging van het virus
Uitdunnen:	handeling die tot doel heeft om na het kiemen, het aantal planten in het perceel aan te passen door het uittrekken van de overtollige planten