



PLANT RESEARCH INTERNATIONAL

Fiche d'information destinée au public

PLANT RESEARCH INTERNATIONAL B.V.

Essais de pommiers génétiquement modifiés présentant une meilleure résistance aux champignons phytopathogènes

No d'identification européen du dossier de notification
B/BE/02/V1

La dissémination d'organismes génétiquement modifiés (OGM) dans l'environnement est strictement réglementée au niveau européen par la directive 90/220/EEG (récemment remplacée par la directive 2001/18/EG de 12 mars 2001) et au niveau belge par arrêté royal (AR) de 18 décembre 1998 « relatif à la réglementation de l'introduction volontaire dans l'environnement ainsi que de la mise au marché des OGM ou des produits en contenants ». Pour garantir l'utilisation sans risque des OGM les deux textes de loi stipulent entre autres que la dissémination d'OGM à titre expérimental est interdite sans l'autorisation préalable écrite du ministre compétent. L'octroi d'un accord dépend d'une évaluation minutieuse de la biosécurité de la dissémination projetée (évaluation de risque) à faire par le Conseil de la Biosécurité.

Afin d'obtenir l'autorisation nécessaire du ministre compétent, le centre de recherche Plant Research International a introduit un dossier de demande d'autorisation auprès du service de l'Inspection générale des Matières premières et des Produits transformés des autorités compétentes. Malgré l'avis favorable (sous conditions) du Conseil de la Biosécurité pour la première phase de l'expérimentation, le ministre compétent n'a pas accordé l'autorisation à Plant Research International pour faire les expérimentations avec des pommiers transgéniques de 2002 à 2008, telle que décrites dans la demande B/BE/02/V1. La dissémination était envisagée dans un site d'essai en Flandre en territoire de la municipalité de Melle.

Responsable à contacter pour des renseignements complémentaires relatifs aux essais :

H.A.J.M. Toussaint

Plant Research International B.V.

Postbus 16

6700 AA Wageningen

Pays-Bas

Téléphone : 00 31 317 47 70 17

Télécopie : 00 31 317 41 80 94

Adresse électronique : info@plant.wag-ur.nl

SiteWeb : www.plant.wageningen-ur.nl

0. Table des matières :

0. Table des matières :.....	2
1. Description des plantes génétiquement modifiées:.....	3
2. But de l'essai:.....	3
3. Sommaire des activités antérieures et futures :.....	4
4. Avantages pour l'environnement, l'agriculteur et le consommateur :.....	4
5. Biologie et cycle de vie de la plante utilisée :.....	5
5.1. Biologie générale de la plante utilisée:.....	5
5.2 Biologie reproductive de la plante utilisée.....	5
6. Effets ou risques éventuels pour l'environnement :.....	6
6.1. La fécondation croisée et la diffusion dans les écosystèmes naturels :.....	6
6.2. Interactions avec les organismes visés :.....	7
6.3. Interactions avec des organismes non-visés:.....	7
6.4. Impact de l'utilisation à grande échelle et à long terme :.....	8
7. Des mesures de restriction, de contrôle et de suivi :.....	8
7.1. Contrôle de la dissémination du pollen :.....	8
7.2. Contrôle de la dissémination des graines transgéniques :.....	8
7.3. Traitement post-récolte, suivi et contrôle:.....	8
8. Destruction du matériel transgénique :.....	9
9. Situation d'urgence :.....	9
10. Inspection :.....	9
11. Rapport d'activités :.....	9
12. Aspects socio-économiques :.....	10
13. Liste de références :.....	10

1. Description des plantes génétiquement modifiées:

Le pommier cultivé, *Malus pumila* Mill., constitue une culture fruitière importante aux Pays-Bas et en Belgique. Les pommiers sont cultivés généralement en monoculture et ils sont atteints par des insectes et des champignons phytopathogènes, parmi lesquelles la tavelure. En augmentant la résistance naturelle aux maladies, l'utilisation des pesticides pourra diminuer. Cette résistance peut être améliorée par l'introduction d'un gène de résistance.

Dans cette recherche, un petit morceau de matériel génétique portant un tel gène de résistance est introduit dans la pomme. Ce gène est responsable de la production d'hordothionine, une petite protéine qu'on rencontre en conditions naturelles dans l'orge et dont des essais au laboratoire ont démontré l'effet inhibant sur la croissance du champignon de tavelure. En outre, un gène d'identification et un gène de sélection ont été introduits afin de pouvoir distinguer le tissu transformé du tissu non-transformé.

Au laboratoire, cette modification génétique a été réalisée en faisant pousser des petites bandes de feuille ensemble avec une bactérie spéciale, *Agrobacterium tumefaciens* tribus AGL0, étant capable de transférer de petits morceaux de matériel génétique (ADN) aux cellules de plantes. Les plantes génétiquement modifiées potentiellement ont enraciné *en vitro* après avoir subi une première caractérisation et elles sont ensuite transférées en serre. Un certain nombre de ces plantes s'avéraient présenter une résistance augmentée à la tavelure dans des essais en serre.

2. But de l'essai:

Le but de cet essai sur le terrain, utilisant les variétés Elstar et Gal, est de vérifier si les effets trouvés au laboratoire et en serre se manifestent aussi au champ. En serre, ce n'est que la résistance à la tavelure qui a été testée. Dans des essais bio (*en vitro*) un effet inhibant sur le chancre européen (*Nectria galligena*) a été trouvé et dans la littérature concernant le rôle de thionine, il paraît que les organismes modifiés sont probablement résistants à plusieurs agents pathogènes. C'est pourquoi les agents pathogènes les plus importants rencontrés au pommier, la tavelure (*Venturia inaequalis*), le mildiou (*Podoshiera leucotricha*) et le chancre européen (*Nectria galligena*), sont étudiés.

Les clones présentant une atteinte clairement moins importante en serre, seront testés dans un essai de champ.

Le but de cet essai de champ est :

- de tester l'occurrence de cette résistance aux champignons phytopathogènes sur l'arbre, en conditions du champ,
- de tester des arbres au champ pour leur résistance à d'autres maladies fongiques (mildiou, chancre) et
- d'apprécier les fruits produits par des arbres génétiquement modifiés sur l'apparence de la tavelure.

L'essai comprend deux phases :

1. première phase (3 ans), des observations de maladies, et si les différences de résistance prévues sont présentes et suffisamment importantes,

2. deuxième phase (3-4 ans) pour l'évaluation des effets sur les caractéristiques de floraison et les fruits.

Il faut noter formellement ici qu'une mise sur le marché de ce matériel transgénique ne constitue pas le but de ce projet et n'est d'aucune façon en cause.

3. Sommaire des activités antérieures et futures :

Les plantules de pommiers transgéniques ont été créés au laboratoire, au cours de l'année 1997 par l'introduction d'un gène de résistance. En 1998, les plantules dans la culture *in vitro* étaient prêtes pour le repiquage au sol et en serre. Là, une première expérimentation de résistance au champignon de tavelure a été faite, utilisant des plants d'environ 25 cm. Certains plants ont paru moins sensibles. En hiver, des yeux ont été greffés aux porte-greffes afin d'obtenir de chaque plant (clone) transgénique plusieurs individus, présentant aussi une plus grande homogénéité de taille et de force végétative. Ce matériel a été évalué dans des essais répétés. Un certain nombre de numéros de clone se sont avérés encore moins sensibles (jusqu'à une réduction de 50% de symptômes). Nous voudrions savoir maintenant si et comment ce phénomène persiste au champ. Pour avoir une impression assez complète, l'essai de champ doit continuer pendant 3 à 7 années. S'il paraît qu'au champ également le matériel est moins sensible à la tavelure, rien ne se fera plus de ce matériel, mais nous saurons que le gène introduit fonctionne ! Une série de nouveaux pommiers transgéniques sera faite utilisant ce gène. Dans le produit final, il ne figure que ce gène et il n'y a pas d'autres gènes tels que le gène de résistance aux antibiotiques (pour sélection) ni le gène *gus* (comme rapporteur). Ceux-là ne seront plus nécessaires pour la mise sur le marché. Il est évident que la création d'une nouvelle série sera une affaire de 6 à 7 ans, avant qu'on soit au point de les avoir testés et qu'ils soient confirmés pour leur résistance. Des tests de goût et d'autres tests sont à mener avant de les rendre disponibles aux producteurs et consommateurs.

4. Avantages pour l'environnement, l'agriculteur et le consommateur :

La tavelure est la maladie la plus importante dans la culture fruitière de l'Europe du Nord-Ouest. Tant dans la culture conventionnelle que dans la culture écologiste et même dans la culture biologique, plusieurs traitements (10 à 15) par année aux pesticides sont administrés pour lutter contre la tavelure. Au niveau de la culture biologique, des composés sulfureux y sont employés, dans d'autres cultures il s'agit des produits phytosanitaires chimiques et synthétiques.

Par la politique menée en Europe qui est de diminuer l'usage des produits chimiques jusqu'à 90 %, l'incidence des maladies peut augmenter et la propagation de cette maladie des fruits (la tavelure) peut accélérer. L'augmentation du niveau de la résistance par la modification génétique peut mener à une baisse de l'usage de produits phytosanitaires chimiques et est en ligne avec cette politique proposée. Elle peut mener en plus à une production plus efficace de pommes grâce à la réduction des pertes de récolte. On s'attend à ce que l'atteinte des fruits par la tavelure secondaire (même champignon) baissera également.

5. Biologie et cycle de vie de la plante utilisée :

5.1. Biologie générale de la plante utilisée:

Dans l'expérimentation, il s'agit de la culture de pommier, *Malus pumila* Mill. Dans le pommier, il existe des formes cultivées (vergers) à côté des types sauvages et des types ornementaux. Pour la culture, des plantes issues de la multiplication végétative sont utilisées. A cette fin, un petit fragment de tige est greffé au porte-greffe (en hiver) ou un oeil est écussonné au porte-greffe (en été). Outre pour la rapide multiplication végétative, le porte-greffe est utilisé pour réduire la croissance végétative et l'atteinte rapide de la phase productive de l'arbre. Dans la plupart des cas, il faut une pollinisation croisée pour atteindre un bon niveau de fructification. La fécondation croisée se fait principalement par les insectes et le vent. La période végétative est de 4 à 7 années aussi bien dans des écosystèmes naturels qu'en conditions de culture. Cependant, pour la culture on n'utilise que le matériel issu de la multiplication végétative, par greffage ou écussonnage au porte-greffe. Le pommier cultivé peut s'intercroiser avec le pommier sauvage (d'autres espèces de *Malus*) et avec les espèces ornementales de *Malus*. Les espèces de *Malus* sont cultivées pour la consommation (*Malus pumila*) mais elles sont aussi plantées dans des parcs et des jardins pour leur valeur ornementale. En Belgique et aux Pays-Bas, il s'agit de dizaines d'espèces de *Malus*. Certaines sont issues de croisements interspécifiques (spontanés ou intentionnels). Nombre d'espèces de *Malus* s'intercroisent et donnent des descendants fertiles. Des plantules de pommier en état sauvage sont souvent issues de graines de trognons. Cela se manifeste par la taille du fruit et le phénotype de l'arbre. Dans la pratique, on les rencontre de temps en temps sur les terrains de loisirs. En outre, des oiseaux sont capables de diffuser les graines des *Malus* ornementales. Le plus souvent, les plantes issues de ces graines, portent, lorsqu'ils ont grandi, des fruits beaucoup plus petits, tandis qu'ils ont « l'air plus sauvage » (des feuilles plus petites, une ramification plus importante). Ces plantes se rencontrent rarement en régions naturelles. Pour ces plants aussi il est vrai que les risques de diffusion sont assez restreints. En outre, les gelées nocturnes survenant pendant la floraison peuvent réduire la reproduction. Les pommiers génétiquement modifiés utilisés dans cette expérimentation ne sont pas différents de ceux ayant été décrits ci-dessus. A proximité du terrain d'essai, il n'y a pas de vergers ni de plantes sauvages parentées.

5.2 Biologie reproductive de la plante utilisée

5.2.1 Reproduction sexuée

• pollen et pollinisation

En conditions naturelles, la pomme se reproduit par voie sexuée par la pollinisation croisée, c'est à dire qu'il faut d'autres individus dans les environs pour la production du pollen. La dissémination de pollen est assez restreinte. Des recherches menées dans les vergers utilisant des gènes marqueurs, ont démontré que la plus grande partie du pollen reste dans un rayon de 5 mètres autour d'un arbre. Sur quelques dizaines de mètres d'un arbre, très peu de pollen est trouvé. D'où la plantation dispersée de plusieurs variétés dans la pratique, afin de réaliser une bonne pollinisation et fructification. Toutefois, il est possible de trouver du pollen sur des centaines de mètres, probablement à la suite des vitesses de vents très élevées. Dans la pratique,

c'est à dire dans les vergers, des colonies d'abeilles sont placées pour améliorer la pollinisation. Bien qu'une abeille soit capable d'aller loin en volant, il paraît que les colonies d'abeilles ont tendance à rester proche du verger ("fixées à la fleur").

- **graines et fruits**

Le pommier se maintient difficilement en état sauvage en Europe du Nord-Ouest. L'homme, en jetant les trognons, est un acteur important dans l'émergence de plantules de pommiers dans les régions naturelles. Les graines nécessitent cependant des conditions spécifiques pour permettre leur germination et ils pourrissent rapidement en conditions d'humidité et des températures modérées. En outre, les plants poussent lentement. La restriction la plus importante aux Pays-Bas est le fait que finalement le pommier nécessite tant d'espace que très peu de graines ont la chance de grandir en arbre. La chance d'un plant sauvage se propageant plus loin est encore limitée par le radius restreint de la diffusion du pollen.

Dans le verger du Plant Research International à Wageningen, des pommiers spontanés issus des graines ne sont jamais trouvés, d'un côté par l'absence des conditions spécifiques nécessaires pour permettre la germination et de l'autre côté parce que des traitements aux herbicides s'appliquent entre les arbres. Egalement pendant cette expérimentation, le désherbage normal se fait.

5.2.2 Reproduction asexuée

Pour le pommier des possibilités de propagation végétative par des racines ou d'autres parties des plantes ne sont pas connues. Il est aussi important à noter que les plantes transgéniques sont greffées sur les porte-greffes non-transgéniques.

6. Effets ou risques éventuels pour l'environnement :

6.1. La fécondation croisée et la diffusion dans les écosystèmes naturels :

- Dissémination du pollen transgénique :

Les plantes ont été greffées sur un porte-greffe régulier M9 (il s'agit alors d'un porte-greffe non-modifié); les petits arbres de deux ans sont plantés à la main au printemps. Pendant la première phase (3 ans) des observations pathologiques (le degré d'atteinte par la tavelure, le mildiou et le chancre) se font. A partir de la deuxième année, normalement les arbres devraient commencer à fleurir. Dans cette première phase, la floraison est empêchée. Pour ce faire, lors de la première période de croissance et la période suivante (pendant laquelle les boutons de fleurs sont formés pour l'année prochaine) des pulvérisations sont appliquées utilisant une hormone végétale naturelle, la gibbérelline. C'est une méthode qui est appliquée plus souvent dans la recherche fruitière. La floraison diminue considérablement à la suite du traitement. Au printemps (avril/mai), les fleurs éventuellement formées sont éliminées à la main.

Lorsque les résultats de la première phase sont positifs, quant aux différences de résistance visées, la deuxième phase peut commencer (environ 3-4 ans). Dans cette phase, la floraison est indispensable pour pouvoir étudier les effets éventuels sur les caractéristiques de floraison et pour apprécier les fruits. C'est pourquoi une partie des pommiers ne sera plus traitée avec des gibbérellines. Les fleurs de ces arbres seront enveloppées à temps et fécondées à la main si bien

que la dissémination de pollen soit impossible. Ces mesures permettent de limiter les effets à l'objet de l'expérimentation.

- Dissémination des graines transgéniques :

Comme stipulés ci-dessus, la floraison et la formation des graines sont empêchées jusqu'à la dernière phase de l'essai, ainsi empêchant la dissémination des graines dans l'environnement. Dans la dernière phase, en août, les fruits sont marqués et en septembre, les fruits sont récoltés à la main. Chaque semaine, les pommes éventuellement tombées sont ramassées pour éviter la libération de graines. Un contrôle de pommiers spontanés issus des graines se fait, également dans les deux ans suivant l'expérimentation. Comme déjà indiqué, des plants spontanés ne sont jamais trouvés aux vergers et ne sont pas prévus non plus ici.

- Avantage sélective:

La dissémination de pollen et des graines est alors empêchée. Les résidus de feuilles en soi ne contribuent pas à la dissémination des caractères nouvellement introduits et l'hordothionine y présente aura aussi peu d'effet sur la flore et la faune du sol que l'hordothionine présente dans l'orge et se retrouvant dans le milieu à la suite de sa culture. En principe, il est possible que les graines, si le gène de *hth* s'y manifeste, sont plus tolérantes aux champignons et bactéries grâce à l'activité de l'hordothionine. Ceci pourra prolonger la durée de survie. En ce qui concerne les plantes, il faut noter qu'il est apparu que les OGM, du moins dans une phase jeune et en serre, sont plus résistants à la tavelure. Dans cet essai de champ, il est étudié s'il en est de même pour la situation de champ. Probablement, les arbres sont également plus résistants aux autres pathogènes. Ceci fera aussi objet de cet essai de champ. En principe, ceci pourra permettre aux OGM d'avoir un avantage sélectif. Cependant, l'infection par des pathogènes spécifiques aux cultures joue surtout un rôle dans le cas des monocultures, où le pouvoir infectieux peut être grand. Néanmoins, un avantage sélectif est possible en conditions naturelles.

6.2. Interactions avec les organismes visés :

Selon les attentes, celles-ci seront très limitées, parce qu'il n'est question que d'une sensibilité réduite au champignon de tavelure. Le champignon n'est pas complètement détruit et survivra, soit-il en moindre mesure, dans l'environnement, surtout aussi sur les plantes de contrôle non-transgéniques et susceptibles, lesquelles sont associées aussi à l'expérimentation. La pression exercée par des maladies dans la période de la culture diminuera mais ne disparaît pas totalement. A l'issue de l'expérimentation, la population peut se remettre. La culture de l'orge n'a pas non plus mené à la disparition de la maladie.

6.3. Interactions avec des organismes non-visés:

Les plantes transformées produisent de l'hordothionine. Les thionines se rencontrent dans de nombreuses céréales cultivées et de se fait elles sont beaucoup consommées. Des animaux consomment de grandes quantités de céréales non-transformées. Les hommes consomment les

parties de la plante sous forme transformée ou non-transformée. Thionine est une protéine riche en arginine/lysine et elle est alors très sensible aux protéases et trypsines se trouvant dans la salive et dans le tube digestif. C'est pourquoi elles s'assimilent directement à la consommation. Des interactions significatives n'étant pas attendues, selon les attentes les effets éventuels sur l'environnement de ces interactions seront absents ou seront très minimaux,.

6.4. Impact de l'utilisation à grande échelle et à long terme :

Le but unique de cette expérimentation est d'étudier les possibilités d'une résistance augmentée aux pathogènes en conditions du terrain, afin de réduire l'utilisation de pesticides. Les pommiers modifiés à tester ici ne sont pas destinés à la mise sur le marché. Des données sur l'utilisation à grande échelle éventuelle ne sont pas d'importance donc.

7. Des mesures de restriction, de contrôle et de suivi :

7.1. Contrôle de la dissémination du pollen :

Lors de la première phase de l'essai, la floraison, et de ce fait la production et la dissémination du pollen sont empêchées par la pulvérisation aux gibbérellines. Au printemps, les fleurs qui sont formées en dépit du traitement sont éliminées manuellement et ensuite détruites.

Lors de la deuxième phase de l'essai, dans laquelle la fructification et alors la floraison sont indispensables, la dissémination de pollen est empêchée en enveloppant les fleurs à temps et en procédant à une pollinisation manuelle.

7.2. Contrôle de la dissémination des graines transgéniques :

La dissémination des graines transgéniques est impossible en fait comme les pommes éventuellement formées et tombées sont d'abord marquées. A la fin de la saison elles sont ramassées et testées pour être détruites finalement.

7.3. Traitement post-récolte, suivi et contrôle:

Au bout de l'expérimentation, les arbres sont arrachés et le sol est fraisé (les porte-greffes des arbres ne sont pas génétiquement modifiés). Les arbres sont hachés, les résidus sont ramassés et brûlés sous contrôle et sous la supervision du scientifique responsable. Après l'arrachage des arbres de l'expérimentation, la parcelle est incluse dans la rotation régulière des cultures (maïs, blé, pommes de terre). L'expérimentation terminée, durant deux ans, des contrôles de plants spontanés ont lieu. A la parcelle, il y aura une culture de rotation utilisant des cultures non-parentées. Les plants de pommiers, survivant les mesures de traitement de sol et culturaux, y

compris les mesures de désherbage (voir auparavant, pour connaître les attentes concernant cet aspect), seront rassemblés et détruits au moyen de l'autoclave, selon le matériel.

8. Destruction du matériel transgénique :

L'expérimentation terminée, tout le matériel est rassemblé et détruit par combustion et sous supervision. Après avoir été testés, les émondes et les pommes sont détruites de la même manière ou en autoclave, selon la quantité du matériel.

9. Situation d'urgence :

Au cas d'une situation d'urgence, l'expérimentation sera arrêtée immédiatement et le matériel sera rassemblé et détruit par la combustion contrôlée, dans une installation d'incinération appropriée.

10. Inspection :

L'Inspection générale des Matières premières et des Produits transformés du Ministère des Classes moyennes et d'Agriculture en Belgique est chargée du contrôle des essais sur le terrain des plantes transgéniques. Afin de planifier ses contrôles, le notifiant est tenu d'informer préalablement le service compétent de la date de semis et de récolte. Sur le terrain, des contrôleurs veillent à ce que les activités de semis et de récolte soient exécutées conformément à l'autorisation ministérielle et aux différents protocoles. En outre, les contrôleurs prennent des échantillons du matériel végétal lesquelles sont analysées aux laboratoires officiels.

11. Rapport d'activités :

A la fin de la saison culturelle, il faut faire parvenir au service compétent, c'est à dire l'Inspection générale des Matières premières et des Produits transformés, un rapport d'activités, établi par le notifiant, et ce au plus tard le 31/12/2002. Ce rapport d'activités comprend au moins les données suivantes :

- une copie du livre de bord,
- le lieu et la période de la dissémination,
- le caractère précis du matériel transformé qui a effectivement été disséminé,
- la superficie réelle de la parcelle d'expérimentation,
- les objectifs ou l'objectif des expérimentations,
- la fréquence des observations faites à la parcelle d'expérimentation et leur caractère,
- les mesures étant prises pour éviter la dissémination involontaire du matériel transgénique à l'extérieur de la parcelle d'expérimentation,
- la méthode utilisée pour détruire les produits récoltés et son efficacité,
- les résultats obtenus dans l'expérimentation,
- un résumé de la surveillance réalisée sur la parcelle d'expérimentation.

12. Aspects socio-économiques :

Dans la culture de pommiers, des pesticides sont appliqués en grande échelle pour lutter contre les maladies et les ravageurs. Non seulement dans la culture traditionnelle, mais également au niveau de la culture intégrée et biologique l'application de pesticides semble indispensable.

Augmenter la résistance aux maladies (fongiques) pourra non seulement réduire la quantité des produits, mais également la dépendance de tels produits. Et cet effort concorde exactement avec les objectifs de la politique actuelle menée par les autorités européennes. L'amélioration du pommier par des techniques de croisements conventionnelles constitue un processus difficile et de longue durée, la formation de graines étant mauvaise et la germination des graines l'étant aussi. La période végétative encore est de 4 à 7 années. Dans un programme de rétrocroisements dans le but d'introduire par hybridation chez une bonne variété la résistance, provenant d'une espèce apparentée sauvage ou d'une variété inférieure, il faut au moins 4 à 5 cycles d'hybridation. De cette manière, le développement prend donc au total au moins 16 ans. Dans le genre *Malus* il n'existe pas beaucoup de résistances aux différentes maladies. Ceci aussi limite les possibilités d'obtenir des résultats dans un délai relativement bref avec maintien de la qualité. La modification génétique offre la possibilité d'incorporer dans une fois chez une bonne variété existante une résistance et elle fait clairement augmenter le nombre de gènes disponibles. Peut-être que dans notre cas, des gènes d'orge sont appropriés pour armer la pomme contre les champignons. Les avantages de ces OGM pour l'environnement en ce qui concerne la réduction de l'usage de pesticides seront certainement rendus publique par la presse, si effectivement l'effet visé peut être démontré par cette expérimentation de champ.

13. Liste de références :

- Florack D.E.A. et al: Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. *Plant. Mol. Biol.* 26 (1994): 25-37
- Wertheim S.J.: *Malus* cv. Baskatong as an indicator of pollen spread in intensive apple orchards. *J. Hort. Sci.* 66(1991): 635-642.