

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 03 december 2014
KENMERK CGM/141203-01
ONDERWERP Aanbieding onderzoeksrapport 'Can interactions between Bt proteins be predicted?'

Geachte mevrouw Mansveld,

De COGEM heeft laten onderzoeken hoe in de milieurisicobeoordeling omgegaan moet worden met insectenresistente genetisch gemodificeerde (gg-) gewassen waarin meerdere toxinegenen zijn ingebracht. Dergelijke gewassen zijn lastig te beoordelen omdat toxines elkaars werking kunnen beïnvloeden waardoor onverwachte effecten kunnen optreden.


Het onderzoeksproject bestond uit meerdere deelonderzoeken. Bijgevoegd rapport omvat het tweede deelonderzoek. Eerder is u al het rapport behorende bij het eerste deelonderzoek aangeboden.¹

De COGEM heeft ook een internationale workshop georganiseerd over de interacties tussen in gg-gewassen ingebrachte toxines. Het verslag van de workshop met daarin de belangrijkste conclusies zal u op een later tijdstip aangeboden worden.

De resultaten van de verschillende projecten zullen gebruikt worden om een advies op te stellen met daarin de eisen die aan de milieurisicobeoordeling van insectenresistente gg-gewassen met meerdere toxinegenen gesteld worden.

Uit bijgevoegd rapport blijkt dat sommige van de door gg-gewassen geproduceerde toxines een bredere werking hebben dan alleen op het plaagorganisme waartegen ze zijn gericht, en

1. CGM 2014-02 'Bacillus thuringiensis toxins: their mode of action and the potential for interaction between them'



dat sommige toxines daadwerkelijk elkaars werking blijken te beïnvloeden. In het rapport wordt een beslisboom gepresenteerd die als hulpmiddel kan dienen om te bepalen wat voor studies er nodig zijn om eventuele effecten van gg-gewassen met meerdere Bt-toxinegenen op niet-doelwitorganismen te beoordelen. De COGEM zal onderzoeken of er voldoende wetenschappelijke onderbouwing is om deze beslisboom in de milieuriscobeoordeling te implementeren.

Achtergrond

Bij de vergunningsprocedure voor teelt van gg-gewassen vormt de beoordeling op het mogelijk optreden van schadelijke effecten op zogenaamde niet-doelwitorganismen een belangrijk onderdeel van de milieuriscobeoordeling. Dit speelt met name een rol bij gg-gewassen die resistent zijn tegen plaagorganismen.

Niet-doelwitorganismen zijn alle organismen die niet gerekend worden tot de plaagorganismen (doelwitorganismen) waartegen het gewas met behulp van bijvoorbeeld bestrijdingsmiddelen of een genetische modificatie beschermd wordt. Insectenresistentie door middel van genetische modificatie wordt bewerkstelligd door specifieke toxine producerende genen van de bacterie *Bacillus thuringiensis* (Bt) in te brengen. Deze toxines zijn dodelijk voor bepaalde voor het gewas schadelijke plaaginsecten.

In de afgelopen jaren is veel ervaring opgedaan met de milieuriscobeoordeling van gg-gewassen die één Bt-toxinegen tot expressie brengen (zogenoemde 'single events'). Het gebeurt echter steeds vaker dat er meerdere Bt-genen in een gg-gewas worden ingebouwd (zogenoemde 'stacked events' of 'stacks'). Deze 'stacked events' worden doorgaans verkregen door verschillende 'single events' met elkaar te kruisen.

Voor de milieuriscobeoordeling van een gg-gewas dat een Bt-toxinegen tot expressie brengt, wordt in laboratoriumstudies een set van niet-doelwitorganismen aan het betreffende Bt-toxine blootgesteld. Toxines kunnen elkaars werking beïnvloeden (interactie). Als er meerdere toxines aanwezig zijn, zou bijvoorbeeld het werkingsspectrum (de specificiteit) van een toxine kunnen veranderen. Of, in het geval van synergie, kunnen effecten bij lagere doses optreden dan men op grond van de experimenten die met de afzonderlijke toxines zijn uitgevoerd, zou verwachten.

Daarom is het bij de milieuriscobeoordeling van 'stacks' van insectenresistente gg-gewassen van belang dat bekend is of er interactieve effecten bij niet-doelwitorganismen kunnen optreden. Bij vergunningaanvragen worden ten behoeve van de milieuriscobeoordeling echter alleen studies aangeleverd die óf zijn uitgevoerd op niet-doelwitorganismen met de 'single events' waaruit de 'stack' is samengesteld, óf de studies zijn uitgevoerd met Bt-toxinemengsels aanwezig in de 'stack', maar dan is alleen het effect op plaagorganismen getest.



Om een beter inzicht te verkrijgen hoe bij 'stacked events' eventuele effecten op niet-doelwitorganismen beoordeeld moeten worden, heeft de COGEM twee onderzoeksopdrachten laten uitvoeren.

Onderzoeksvragen

De onderzoeksvragen die de COGEM had opgesteld, waren als volgt: 1) zijn bepaalde combinaties van verschillende Bt-toxines in staat om, en zo ja in welke mate, elkaars werking te beïnvloeden, 2) is het mogelijk om, bijvoorbeeld op basis van het werkingsmechanisme van een Bt-toxine, te voorspellen of interacties tussen Bt-toxines zullen optreden, en 3) welk type experimenten of gegevens zijn noodzakelijk om eventuele effecten op niet-doelwitorganismen van een 'stacked event' te kunnen beoordelen?

Bij de eerste onderzoeksopdracht, uitgevoerd door dr. N. van der Hoeven werkzaam bij 'ECOΣTAT' (Statistical Consultancy in Ecology, Ecotoxicology and Agricultural Research), is een biochemische en toxicologische invalshoek gevolgd om de eerste deelvragen te beantwoorden. Het daaruit voortgekomen rapport (CGM 2014-02 '*Bacillus thuringiensis* toxins: their mode of action and the potential for interaction between them') en de begeleidende aanbiedingsbrief (CGM/141014-01) zijn u onlangs toegezonden. De voornaamste conclusies van het rapport zijn dat synergisme tussen Bt-toxines voorkomt, en dat effecten op plaagorganismen niet geëxtrapoleerd kunnen worden naar niet-doelwitorganismen.

De onderhavige aanbiedingsbrief bespreekt de bevindingen van de tweede onderzoeksopdracht en de conclusies van de COGEM. Het bijbehorende onderzoeksrapport is getiteld 'Can interactions between *Bt* proteins be predicted and how should effects on non-target organisms of GM crops with multiple *Bt* proteins be assessed?' (CGM 2014-05). In het rapport worden de onderzoeksvragen vanuit het perspectief van de milieurisicobeoordeling van gg-gewassen benaderd. Het onderzoeksrapport is geschreven door dr. A. De Schrijver van de Dienst Bioveiligheid en Biotechnologie van het Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid in België. Het onderzoeksproject is uitgevoerd in samenwerking met collega's van de universiteit van Gent (België), Plant Research International van Wageningen UR en Entomica (Canada).

Belangrijke punten uit het bijgevoegde onderzoeksrapport

In het rapport zijn op basis van 'deskresearch' in figuren en tabellen de activiteitspectra van en interacties tussen Bt-toxines inzichtelijk gemaakt. Op basis daarvan wordt een beslisboom gepresenteerd, die als hulpmiddel kan dienen om te bepalen wat voor studies er nodig zijn om eventuele effecten van gg-gewassen met meerdere Bt-toxinegenen op niet-doelwitorganismen te beoordelen.



Werkingspectrum van Bt-toxines vertoont kruisactiviteit

Eerder is al gebleken dat de kennis over de specificiteit van Bt-toxines beperkt is, en dat deze slechts van enkele toxines uitgebreid is onderzocht. Daaruit bleek dat er aanwijzingen zijn voor kruisactiviteit: de toxines zijn werkzaam tegen insecten buiten de groep van insecten waarvoor ze primair bedoeld zijn.

Op basis van literatuuronderzoek presenteert het huidige rapport nieuwe aanvullende gegevens over de kruisactiviteit van Bt-toxines. Inmiddels zijn er voor een twintigtal eiwitten aanwijzingen dat zij kruisactiviteit vertonen (meestal wordt bij de beoordeling van kruiseffecten voor een groep insecten de taxonomische eenheid 'orde' aangehouden). Voor twee Bt-toxines wordt deze kruisactiviteit al bij lage toxinedoses waargenomen. Tevens lijkt er niet alleen kruisactiviteit tussen diverse insectenordes te bestaan, maar ook kruisactiviteit die zich uitstrekt tot niet-geleedpotigen. Een drietal Bt-toxines met een primaire specificiteit tegen insecten, vertonen bij hoge doses ook toxiciteit tegen nematoden.

Kennis over Bt-toxine interacties betreft hoofdzakelijk studies met plaagorganismen

Het rapport beschrijft dat op basis van literatuuronderzoek een 50-tal experimentele studies werd gevonden die interacties tussen Bt-toxines bij ongewervelde plaagorganismen onderzochten, waaronder muggen. Slechts twee studies onderzochten effecten bij niet-doelwitorganismen.

Interacties bij mengsels van Bt-toxines kunnen slechts beperkt voorspeld worden

De onderzoekers concluderen dat bij gg-gewassen met meerdere Bt-toxinegenen:

- 1) er nog te weinig informatie bekend is om voorspellingen over interacties te kunnen doen als bepaalde Bt-toxines aanwezig zijn (namelijk de zogenaamde Vip- of Cyt-toxines),
- 2) synergistische en antagonistische interacties kunnen optreden en dat deze mede afhankelijk zijn van het type Bt-toxine,
- 3) het activiteitspectrum van de afzonderlijke Bt-toxines een hulpmiddel is om te voorspellen of er interacties in het 'stacked event' kunnen optreden waarbij
 - a) het onwaarschijnlijk is dat er interacties zullen optreden als het activiteitspectrum van de Bt-toxines niet overlapt en
 - b) de huidige kennis onvoldoende is om een voorspelling te doen als het activiteitspectrum van de toxines wel overlapt,
- 4) een waargenomen interactie tussen Bt-toxines bij de ene insectensoort geen voorspellende waarde heeft voor de interactie bij een andere insectensoort, ook al valt deze binnen dezelfde insectenorde. Binnen een insectenorde blijkt de aard van de interactie tussen insectensoorten te kunnen verschillen. Deze kan voor de ene insectensoort synergistisch zijn en voor de andere antagonistisch.



Samengevat concluderen de onderzoekers dat studies naar effecten op niet-doelwitorganismen met de afzonderlijke Bt-toxines alleen voldoende zijn, wanneer het een specifieke groep toxines betreft, (de zogenaamde 'drie domein kristalvormende toxines' ofwel 3D-Cry toxines), waarvan bovendien de werkingsspectra niet overlappen. Omdat de onderzoekers niet verwachten dat het werkingsspectrum van een toxine onder invloed van andere toxines verandert, kunnen de studies in dat geval beperkt worden tot onderzoek naar de effecten van de afzonderlijke Bt-toxines, en kunnen zij uitgevoerd worden op niet-doelwitorganismen die tot dezelfde orde behoren als de orde van het plaagorganisme waartegen het toxine gericht is. Het effect van de combinatie van toxines hoeft in dat geval dus niet bestudeerd te worden.

Wanneer de primaire activiteiten van Bt-toxines kruisactiviteit vertonen, is het van belang dat het mengsel van de Bt-toxines op niet-doelwitorganismen wordt getest omdat dan synergisme kan optreden. Daarbij kunnen studieresultaten met plaagorganismen niet geëxtrapoleerd worden naar niet-doelwitorganismen.


Overwegingen van de COGEM bij het rapport

De COGEM is van mening dat het rapport een helder overzicht biedt van de in het publieke domein beschikbare kennis over zowel de primaire activiteit als de kruisactiviteit van Bt-toxines. Zij onderschrijft de bevinding van de onderzoekers dat de door gg-gewassen geproduceerde toxines minder specifiek zijn dan gedacht en dat sommige toxines daadwerkelijk elkaars werking blijken te beïnvloeden. Tevens onderschrijft zij de conclusie dat voor de beoordeling van effecten van Bt-toxinemengsels op niet-doelwitorganismen, studies met plaagorganismen niet zinvol zijn, omdat deze gezien hun geringe voorspellende waarde niet geëxtrapoleerd kunnen worden.

De COGEM is van mening dat de in het rapport gepresenteerde beslisboom een handig hulpmiddel kan bieden voor de beoordeling van welke studies naar effecten van Bt-toxinecombinaties in gg-gewassen op niet-doelwitorganismen noodzakelijk zijn. In de beslisboom wordt gesteld dat, onder bepaalde voorwaarden, studies naar de effecten op niet-doelwitorganismen met de 'single events' voldoende zijn indien de werkingsspectra van de Bt-toxines in een 'stacked event' niet overlappen.

Op dit moment is het aantal beschikbare relevante studies nog zeer beperkt. Daarom vraagt de COGEM zich af of er wel voldoende onderbouwing voor de beslisboom bestaat. De beslisboom is door de onderzoekers voorgelegd aan de deelnemers van een internationale workshop over de interacties van combinaties van Bt-toxines op niet-doelwitorganismen die 15 oktober jl. heeft plaatsgevonden. Deze workshop was mede door de COGEM georganiseerd. Het verslag van de workshop met daarin de belangrijkste conclusies zal u op een later tijdstip aangeboden worden.

Op basis van dit rapport, het rapport opgesteld door 'ECOΣTAT' en bovengenoemde internationale workshop, zal de COGEM een samenvattend advies op stellen hoe de



beoordeling van de effecten op niet-doelwitorganismen van insectenresistente gg-gewassen die meerdere Bt-toxinegenen tot expressie brengen, uitgevoerd moet worden. Dit advies zal u eind 2014 aangeboden worden.

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