

Advies betreffende: **Markttoelating 'NK603 maïze tolerant to glyphosate'**

Kennisgever: **Monsanto Europe S.A**

COGEM kenmerk  
**CGM/030319-08**

BGGO nummer  
**C/ES/00/01**

Datum advies  
**21 maart 2003**

## Inleiding

In 2000 is een aanvraag ingediend door Monsanto Europe S.A. voor import, opslag en verwerking van de glyfosaat-tolerante maïslijn NK603 Roundup Ready®. Het betreft de import van maïs (*Zea mays*) waarin het *epsps* gen van *Agrobacterium* sp. stam CP4 is ingebracht. Deze maïslijn is door de inbouw en de expressie van het *epsps* gen minder gevoelig voor het herbicide glyfosaat. De aanmelding betreft import, opslag en verwerking tot producten voor voedings- en veevoedertoepassingen en betreft niet de teelt van maïs in Europa. Met betrekking tot de veevoederveiligheid is het RIKILT gevraagd om advies.

De moleculaire karakterisatie van lijn NK603 is in een eerder stadium als voldoende beoordeeld door de COGEM in het kader van een aanvraag voor de vrijwillige veevoederveiligheidsbeoordeling. De COGEM is op 3 februari gevraagd om een beoordeling van het marktdossier C/ES/00/01. Het ingediende marktdossier was echter onvolledig en bevatte niet de rapporten die nodig waren om de moleculaire karakterisatie te beoordelen. Daarom heeft de COGEM 21 februari (CGM/030219-01) gevraagd om aanvullende informatie. Het onderhavige advies is gebaseerd op het dossier met de aanvullende informatie.

## Modificatie

De maïslijn NK603 is gemodificeerd door middel van transformatie van maïs-embryo cellen met behulp van 'particle acceleration'. Het ingebrachte plasmide-DNA bevat naast een bacterieel origin of replication en het *nptII* gen, twee aangrenzende CP4*epsps* cassettes, die de volgende sequenties bevatten:

*CP4 EPSPS gen cassette 1:*

- P-ract1/ract1 intron van *Oryza sativa* (5'gebied van het rijst *actine* 1 gen, inclusief de promotor, start van transcriptie en intron);
- *Ctp2* uit *Arabidopsis thaliana* (codeert voor een transport eiwit dat het CP4 EPSPS eiwit naar de chloroplast transporteert);
- Cp4 *epsps* uit *Agrobacterium* sp. stam CP4 (codeert voor glyfosaat tolerantie);
- Nos 3' uit *Agrobacterium tumefaciens* (terminator transcriptie).

*CP4 EPSPS gen cassette 2:*

- E35S, *Cauliflower mosaic virus* (promotor);
- *Zmhsp70*, *Zea mays* L. (intron van heat-shock eiwit aanwezig om niveau van gen transcriptie te stabiliseren);

- *Ctp2* uit *Arabidopsis thaliana* (codeert voor een transport eiwit dat het CP4 EPSPS eiwit naar de chloroplast transporteert);
- *Cp4 epsps* L214P uit *Agrobacterium* sp. stam CP4 (codeert voor glyfosaat tolerantie);
- Nos 3' uit *Agrobacterium tumefaciens* (terminator transcriptie).

*Elementen niet voor transformatie bedoeld*

- *ori*, van *Escherichia coli* (origin van replicatie van pUC119);
- *nptII*, Tn5 transposon (coderend voor kanamycine resistentie).

## Overwegingen

De aanvraag omvat de import van maïslijn NK603 en de verwerking van deze maïs tot producten voor voedings- en voedertoepassingen. Aangezien de teelt van de maïs niet in Nederland zal plaatsvinden is de kans op verspreiding van deze genetisch gemodificeerde plant zeer klein. Alleen door verlies van hele maïskorrels bij het verladen en verwerken zou enige verspreiding op kunnen treden. De locaties waar het verladen dan wel het verwerken plaatsvindt zijn in de praktijk ongunstig voor de kieming van maïskorrels. Verder moet in aanmerking genomen worden dat maïs geen inheemse soort is in Nederland en een sterke biologische inperking kent onder Noord-Europese klimaatomstandigheden. Maïs is niet winterhard in Nederland en is hierdoor voor de overleving afhankelijk van de mens. Maïszaden kennen geen kiemrust, waardoor een eventuele kieming snel zal optreden. De gekiemde zaden zijn zeer gevoelig voor opportunistische schimmels en koude. Daarom acht de COGEM de kans op verspreiding van maïslijn NK603 in het milieu (zowel de natuurlijke als de agrarische omgeving) te verwaarlozen.

### *Moleculaire karakterisatie van maïslijn NK603*

De COGEM heeft de door de aanvrager aangeleverde aanvullende informatie met betrekking tot de moleculaire karakterisatie beoordeeld. De karakterisatie van de modificatie van lijn NK603 is voldoende met betrekking tot de aanwezigheid en expressie van de ingebrachte genen in niet herbicide behandelde planten. De aanvrager heeft voldoende aangetoond dat er geen nieuwe eiwitten worden gevormd door de sequenties grenzend aan het 3'-einde van het insert. De 'Northern Blot' analyse laat zien dat er geen detecteerbare transcriptieproducten aanwezig zijn. Daarnaast zijn er door middel van 'Western Blotting' geen immuunreactieve eiwitten met een moleculair gewicht groter dan 47 kDa gedetecteerd in de extracten van NK603 maïs. De afwezigheid van vector-backbone delen is op voldoende wijze aangetoond door middel van 'Southern Blotting' waarbij de complete backbone sequentie als probe is gebruikt.

Echter dient opgemerkt te worden dat met RT-PCR een RNA-transcript aangetoond kan worden dat initieert in het NK603 insert en eindigt in het flankerende genomische DNA. Het is mogelijk dat het RNA-transcript onstabiel is, zoals de aanvrager suggereert, maar dit kan niet geconcludeerd worden uit de 'Northern Blot' analyse. De 'Northern Blot' laat alleen transcripten zien die groter zijn dan 1 kb en het betreffende RNA-transcript is kleiner dan 1 kb.

Daarnaast is het niet duidelijk waarom de aanvrager voor de RNA-analyse materiaal uit het blad van de plant heeft genomen terwijl voor de eiwitanalyse en de voedselveiligheidsanalyse materiaal uit de korrel is genomen. Het feit dat het RNA-

transcript niet wordt aangetoond in de bladeren van NK603, is geen bewijs dat het daarom ook niet aanwezig is in de korrel van NK603.

De COGEM is ondanks deze opmerkingen van mening dat de veiligheid van mens en milieu met betrekking tot lijn NK603 voldoende gewaarborgd is.

De kans dat in het 3'-gedeelte transcripten geïnitieerd worden die leiden tot de vorming van kleine peptiden is zeer klein. Daarbij is geen homologie van deze theoretische voorspelde peptiden aangetoond met potentiële allergenen of toxische eiwitten. Gezien het feit dat het RNA-transcript alleen gedetecteerd kon worden met RT-PCR en niet met 'Northern Blot' analyse, betekent dat het transcript in zeer lage hoeveelheden in de plant voorkomt. Dit is naar alle waarschijnlijkheid een gevolg van instabiliteit van het RNA. Een eventueel translatie-product van dit RNA was niet te detecteren met 'Western Blot' analyse. Er is geen sprake van vorming van aantoonbare chimere eiwitten.

#### *Equivalentie van eiwitten CP4 EPSPS en CP4 EPSPS 214P*

Het CP4 EPSPS eiwit is een goed beschreven eiwit, dat uit de familie van EPSPS eiwitten komt en algemeen vertegenwoordigd is in planten, schimmels en bepaalde bacteriën. In de tweede cassette is nog een EPSPS eiwit aanwezig dat slechts verschilt met het eerste eiwit door een aminozuursubstitutie op positie 214. Er is voldoende aangetoond dat de beide eiwitten CP4 EPSPS en CP4 EPSPS L214P structureel en functioneel equivalent zijn. Met Röntgen-kristallografie is aangetoond dat de structuur van CP4 EPSPS en CP4 EPSPS L214P identiek zijn. Uit de uitgevoerde bepaling van de enzymatische activiteit blijkt dat beide eiwitten ook functioneel niet verschillen. Daarbij komt dat de substitutie van het proline residu op positie 214 in EPSPS eiwitten ook onder in vivo omstandigheden voorkomt.

#### *Equivalentie van microbieel geproduceerd eiwit en NK603 geproduceerd eiwit*

De aanvrager heeft voor toxiciteits- en allergie testen microbieel geproduceerd CP4 EPSPS eiwit gebruikt. Om aan te tonen dat dit microbieel geproduceerd eiwit equivalent is aan plant geproduceerd eiwit, heeft de aanvrager verschillende analyses uitgevoerd. De equivalentie van het microbieel geproduceerde CP4 EPSPS eiwit, aan het door lijn NK603 geproduceerde EPSPS eiwit is op voldoende wijze aangetoond op basis van moleculair gewicht en immunologische respons met behulp van 'Western Blotting'. Dit is bevestigd door de uitgevoerde biochemische karakterisatie met behulp van MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry).

#### *Veiligheid van import en verwerking van NK603*

Met het oog op al eerdere beoordeling van de COGEM van de moleculaire karakterisatie van maïslijn NK603, is de COGEM van mening dat NK603 voldoende gekarakteriseerd is en de veiligheid voldoende onderbouwd is om in te stemmen met het in de handel brengen voor import en verwerking van desbetreffende maïslijn.

De COGEM wijst erop dat voor de veiligheid voor het gebruik als veevoeder het RIKILT reeds positief heeft geadviseerd over deze maïslijn.

## **Advies**

Het voorgaande in overweging nemende is de COGEM van oordeel dat de moleculaire karakterisatie van maïslijn NK603 voldoende is. Voor Noord-Europa geldt bovendien dat maïs niet verwildert, wegens de klimatologische omstandigheden. Verder zijn er geen aanwijzingen dat het construct leidt tot een verhoogde fitness.

Op basis van de informatie van het dossier en de aanvullende rapporten concludeert de COGEM dat met het op de markt brengen (import en verwerking) van maïslijn NK603 de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn en adviseert de COGEM positief over het toelaten op de markt in Nederland van deze maïslijn.

## **Signalering**

Bovenstaand advies heeft betrekking op de situatie in Noord- en Noordwest-Europa. In Zuid-Europa – onder mediterrane omstandigheden – is het wel mogelijk dat maïs verwildert. Onder deze omstandigheden verdient het derhalve aanbeveling om aanvullende maatregelen te overwegen ter voorkoming van introductie van hele zaden in het milieu.