

Advies betreffende: **Insectresistente maïs (MON 863 en MON 863 x MON 810)**

Kennisgever: **Monsanto Europe S.A.**

COGEM kenmerk
CGM/030604-01

BGGO nummer
C/DE/02/09

Datum advies
9 juni 2003

Inleiding

In 2002 is een aanvraag ingediend door Monsanto Europe S.A. voor import, opslag en verwerking van de genetisch gemodificeerde maïslijnen MON 863 en hybride MON 863 x MON 810 tot producten voor voedings- en voedertoepassingen. De MON 863 maïslijn is door de inbouw en de expressie van het *cry3Bb* gen minder gevoelig voor plaaginsecten die tot de kevers (*Coleoptera*) behoren, waarvan de larven van de maïswortelkever (*Diabrotica* spp) in het bijzonder. MON 863 x MON 810 is een maïslijn ontstaan uit een traditionele kruising van de genetisch gemodificeerde maïslijnen MON 863 en MON 810. Deze kruisingslijn bevat behalve het *cry3Bb* gen en het merker gen *nptII* gen, ook het *cryIa(B)* gen, verantwoordelijk voor een additionele tolerantie tegen plaaginsecten zoals de Europese maïsboorder.

Voorgaande COGEM adviezen

De COGEM heeft op 20 januari 2003 (CGM/030120-04) geadviseerd over de moleculaire karakterisatie van deze maïslijnen in het kader van een vrijwillige veevoederveiligheidsbeoordeling. De COGEM heeft destijds negatief geadviseerd over deze aanvraag wegens het ontbreken van gegevens en rapporten, noodzakelijk voor de onderbouwing van de risico-analyse.

Daarnaast dient te worden opgemerkt dat maïslijn MON 810 in 1998 goedgekeurd is voor toelating op de Europese markt. De COGEM heeft een positief advies afgegeven over MON 810 in augustus 1996 (CGM/960807-01).

Aspecten van het gewas

Maïs (*Zea mays* L.) behoort tot de familie van de *Gramineae* en is als landbouwgewas oorspronkelijk afkomstig uit Midden-Amerika. Maïs is overwegend een windbestuiver. Insectenbestuiving speelt bij maïs nauwelijks een rol, maar kan niet volledig worden uitgesloten (1). De levensduur van maïspollen varieert in de literatuur van 30 minuten (2) tot 9 dagen (3). Maïs heeft in Europa geen wilde verwanten en slechts in beperkte delen binnen de landbouw zijn er mogelijkheden tot verwildering. Opslag van maïsplanten is in Europa zelden van landbouwkundige betekenis, en in Nederland in het geheel niet. Aan

de hand van praktijkinformatie uit de Verenigde Staten zijn geen redenen om aan te nemen dat de modificatie het verwilderingspotentieel vergroot.

Moleculair karakterisatie

Beschrijving van de geïntroduceerde genen

Door middel van de transformatie van maïs-embryo's met 'particle bombardment' is de maïslijn MON 863 gemodificeerd. Een restrictie-fragment van het plasmide PV-ZMIR13, dat de *cry3Bb1* expressie-cassette en de *nptII* expressie-cassette bevat, is in de plant gebracht. De twee cassettes bevatten de volgende sequenties:

• *Cry3Bb1* gencassette:

- 4AS1, van het *Cauliflower mosaic virus*; wordt geassocieerd met hoge eiwit expressie niveaus in de wortel;
- *wt CAB*, uit tarwe; bevordert de translatie
- *ract1* intron, uit *Oryza sativa*; bevordert de transcriptie;
- *cry3Bb1*, uit *B. thuringiensis* subsp. *kumamotoensis*; beschermt tegen insecten;
- *tahsp 17 3'*, uit tarwe, stopt de transcriptie en stuurt de polyadenylatie.

• *NptII* gencassette:

- 35S, van het *Cauliflower mosaic virus*, constitutieve promotor, start van de transcriptie;
- *nptII*, uit *E. coli* Tn5, coderend voor neomycine fosfotransferase (kanamycineresistentie);
- *ble* (getrunceerd), uit *E. coli* Tn5, coderend voor een niet functionele bleomycine resistentie;
- Nos 3', uit *Agrobacterium tumefaciens*, stopt de transcriptie.

Daarnaast zijn er een 'origin of replication' en een *nptII* gen onder controle van een bacteriële promotor aanwezig op de vector. Deze sequenties zijn niet aanwezig op het ingebrachte restrictiefragment en zijn niet bedoeld voor het transformatie proces.

De hybride maïslijn MON 863 x MON 810 bevat naast de bovengenoemde sequenties van MON 863 de volgende sequenties uit MON 810:

- 35S, van het *Cauliflower mosaic virus*, start de transcriptie en is een constitutieve promotor;
- *cry1A(b)*, uit *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*; beschermt tegen insecten;
- *hsp70* intron, uit *Zea mays*, stabiliseert gen transcriptie.

Eigenschappen van de geïntroduceerde genen

Verhoging van tolerantie tegen insecten

De tolerantie van maïs tegen insecten is verhoogd, door de planten genetisch te modificeren met genen die coderen voor Bt-toxinen. Het binden van deze δ -endotoxinen aan receptoren in de middendarm van insecten, gevolgd door perforering van de darm, is essentieel voor de bestrijding van plaaginsecten. In deze aanvraag voor markttoelating gaat het om het Cry3Bb1 toxine, dat toxisch is voor de insectenorde van de *Coleoptera* (kevers) en in het bijzonder de larven van de maïswortelkever (*Diabrotica* sp.). De schade, veroorzaakt door deze larven, bestaat uit het wegvreten van kiemplanten en omvallen van maïsstengels. De maïswortelkever is een economisch belangrijk plaaginsect dat grote schade veroorzaakt in belangrijke teeltgebieden in de Verenigde Staten.

Daarnaast gaat het in de hybride maïslijn om het Cr1A(b) toxine, dat toxisch is voor de Europese maïsboorder (*Ostrinia nubilalis*) en andere insecten uit de orde van de Lepidoptera (motten en vlinders), zoals de 'pink borer' (*Sesamia cretica*). De schade, veroorzaakt door deze soorten, bestaat daaruit dat de larven een gat in de stengel boren en de stengel uithollen, waardoor de stengels plooiën en omvallen. De hybride maïslijn bevat dus een dubbele tolerantie tegen *Diabrotica* spp en tegen maïsboorder *Ostrinia*. Beide soorten zijn in de Verenigde Staten van grote landbouwkundige betekenis, en bij de bestrijding van beide soorten is sprake van een aanzienlijk gebruik van gewasbeschermingsmiddelen. Dit gebruik wordt door deze gemodificeerde maïsvariëteiten geheel of grotendeels voorkomen. Daarmee wordt de kans op aanwezigheid van ongewenste residuen van bestrijdingsmiddelen aanzienlijk verlaagd.

De COGEM is van mening dat de veiligheid voor mens en milieu voldoende onderbouwd is met betrekking tot de aanwezigheid van de ingebrachte sequenties in beide maïslijnen. Daarnaast zijn ook de afwezigheid van backbonesequenties als wel de aanwezigheid van de ingebrachte genen voldoende onderbouwd met behulp van PCR technieken. Echter, in het dossier is de sequentie-analyse van de flankerende sequentie aan het 3'einde van de MON 810 maïslijn niet duidelijk. In het dossier worden twee verschillende datasets met sequentiegegevens aangeleverd, die niet met elkaar overeenkomen. Dientengevolge is ook niet duidelijk welke open leesramen hierin aanwezig zijn. De COGEM acht het noodzakelijk dat hieromtrent opheldering wordt gevraagd aan de aanvrager.

De bepaling van de expressie van de ingebrachte genen is weliswaar voldoende onderbouwd in de getransformeerde lijnen en in de F1 planten. Echter, expressie gegevens betreffende de F2-generatie ontbreken. Deze generatie is met name interessant aangezien dit het plantenmateriaal is dat wordt geconsumeerd. In dit materiaal zal het hoogste expressie niveau van beide genen (beide homozygoot aanwezig) gevonden worden en zal een uitsplitsing van twee transgenen gecombineerd

worden met een diversificatie van de genetische achtergrond. Dientengevolge acht de COGEM het van belang dat een expressie- en stabiliteits-analyse van F2 materiaal wordt toegevoegd.

In maïslijn MON 863 is 40% van het *ble* gen aanwezig. In het dossier wordt verwezen naar een rapport (Silvanovich *et al.*, 2000), waarin staat dat met behulp van Western Blotting expressie van een open leesraam in het insert niet gedetecteerd werd. Echter, dit rapport is niet aangeleverd. De COGEM is van mening dat deze informatie noodzakelijk is voor de risicobeoordeling.

Met betrekking tot de toxiciteit-studies van het Cry3Bb1 eiwit geeft de aanvrager tegenstrijdige informatie over de herkomst van het eiwit. In het dossier wordt vermeld dat het eiwit door *E. coli* wordt geproduceerd, terwijl in het dossier bijgevoegde rapport Astwood *et al.* (2001), wordt aangegeven dat het eiwit wordt geproduceerd door middel van Bt fermentatie. De COGEM acht het noodzakelijk dat de aanvrager hierover meer duidelijkheid verschaft.

Met betrekking tot de allergeniteit van het Cry3Bb1 eiwit stelt de aanvrager dat het eiwit goed verteerd wordt in het spijsverteringsstelsel van zoogdieren. Echter, deze informatie wordt niet bevestigd in het dossier door middel van onderzoeksresultaten. De COGEM acht het noodzakelijk dat deze resultaten alsnog aangeleverd worden.

In de door de aanvrager uitgevoerde toxiciteit- en allergie-testen wordt een Cry3Bb1 eiwit gebruikt dat is geproduceerd door *E. coli* en niet door de maïslijn MON 863. De COGEM is van mening dat aan het dossier een equivalentiestudie moet worden toegevoegd, die op afdoende wijze bewijst dat er geen verschil is tussen het bacterieel geproduceerde eiwit en het plant-geproduceerde eiwit. In het dossier wordt slechts een samenvatting gegeven van een equivalentiestudie. De COGEM acht het noodzakelijk om over alle rapporten met betrekking tot de equivalentie van beide eiwitten te kunnen beschikken teneinde tot een onderbouwd oordeel te kunnen komen.

Selectiegenen (antibioticumresistentiegen *nptII*)

Bij de ontwikkeling van de genetisch gemodificeerde maïslijn MON 863 en de hybride MON 863 x MON 810, is gebruik gemaakt van het selectiegen *nptII*. Dit gen is ook aanwezig in de onderhavige lijn. De COGEM heeft reeds eerder positief geadviseerd (CGM/000918-01) over het gebruik van dit selectiegen. De COGEM is dan ook van mening dat het risico voor mens en milieu verwaarloosbaar klein is met betrekking tot het gebruik van *nptII* in maïslijn MON 863 en hybride MON 863 x MON 810.

Echter het Nederlandse standpunt, zoals weergegeven in de Integrale Nota Biotechnologie, is dat bij een marktintroductie van een genetisch gemodificeerd landbouwgewas de aanwezigheid van antibioticumresistentiegen niet is toegestaan. In geval van veldproeven wordt uitsluitend toestemming verleend indien is aangetoond dat

in de planten geen andere antibioticumresistentiegenen zijn ingebracht dan de genen *nptII* en *hpt*.

Fytosanitaire aspecten

Vooralsnog zijn beide doelorganismen, de maïswortelkever en de Europese maïsboorder, niet van belang voor Nederland. De maïsboorder (*Ostrinia nubilalis*) heeft in de in Nederland overwegende snijmaïsteelt weinig kans, omdat de poppen grotendeels worden mee gehakseld. Bovendien is het klimaat niet optimaal voor de Europese maïsboorder.

De maïswortelkever (*Diabrotica*) komt tot op heden niet in Nederland voor. Het betreft hier een soort met een quarantaine status die op de Balkan sinds de oorlog in Bosnië voorkomt en vandaar oprukt naar West-Europa. In de buurt van Parijs is een infectiehaard waargenomen. Het is waarschijnlijk dat deze schadelijke kever ook Nederland zal bereiken. Naar verwachting zal het plaagorganisme zijn quarantaine status verliezen omdat uitroeiing niet mogelijk is en de verspreiding tot dusverre niet te stoppen is. De traditionele strategie, die in belangrijke mate op insecticiden berust, is problematisch voor het milieu. De Bt techniek zoals beschreven is dit marktdossier zou een belangrijke schakel kunnen zijn in een alternatieve aanpak.

Conclusies en Advies

De COGEM is van mening dat het dossier omtrent de marktintroductie van maïslijn MON 863 en van de hybride maïslijn MON 863 x MON 810 onvolledig is waardoor het onmogelijk is om tot een onderbouwde risico-analyse te komen. De COGEM acht het noodzakelijk dat aanvullende informatie betreffende de flankerende sequenties aan het 3'einde van MON 810 maïslijn, de afwezigheid van een gedeelte van *ble* gen, de herkomst van het Cry3Bb eiwit gebruikt in de toxiciteitstudies, de equivalentiestudies van het door de plant en bacterieel geproduceerde eiwit, de sequentieanalyse van de flankerende sequenties, de allergeniteitstudie in zoogdieren en expressie- en stabiliteitgegevens van de F2-generatie worden aangeleverd.

Signalering

Bovenstaand advies heeft betrekking op de situatie in Noord- en Noordwest-Europa. Incidenteel morsen van de genetisch gemodificeerde maïs zal, gezien de geringe kans van verwildering in dit gebied geen additionele risico's opleveren. In Zuid-Europa – onder mediterrane omstandigheden – zou het wel mogelijk kunnen zijn 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. Daarnaast signaleert de COGEM dat de genetisch gemodificeerde maïs een construct met het *nptII* gen bevat. De aanwezigheid van dit antibioticumresistentiegen in genetisch gemodificeerd plantmateriaal wordt door Nederland volgens de Integrale Nota Biotechnologie niet toegestaan voor marktintroductie.

- (1) Rapport "Landbouwkundige risico's van uitkruising van GGO-gewassen" door C.J.A. Hin. van Centrum voor Landbouw en Milieu (CLM), 2001.
- (2) Coe, E. H. Jr., Neuffer, M.G., Hoisington D.A. 1988. The genetics of Corn. pp. 81-258. In Sprangue, G.F., Dudley, J.W., Editors. Corn and Corn Improvement, Third Edition. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin. 986 pp.
- (3) Treau , R., Emberlin, J. 2000. Pollen dispersal in the crops Maize (*Zea mays*), Oil seed rape (*Brassica napus* ssp. *Oleifera*), Potatoes (*Solanum tuberosum*), Sugar beet (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*) and Wheat (*Triticum aestivum*)- Evidence publications. Soil Association.