

Advies betreffende: **Insect resistent and glufosinate ammonium tolerant transformation event 1507 maïze'**

Kennisgever: **Pioneer Hi-Bred Int. en Mycogen Seeds**

COGEM kenmerk
CGM/030919-04

BGGO nummer
C/ES/01/01

Datum advies
24 september

Inleiding

In 2001 is een aanvraag ingediend door Pioneer Hi-Bred Int. en Mycogen Seeds voor teelt, diervoeder toepassingen en industriële verwerking tot producten voor voedings- en voedertoepassingen van de genetisch gemodificeerde maïslijn 1507. De 1507 maïslijn is door de inbouw en de expressie van het *cryIF* gen minder gevoelig voor plaaginsecten met name de Europese maïsboorder (*Ostrinia nubilalis*). Daarnaast is 1507 maïs tolerant voor het herbicide glufosinaat ammonium als gevolg van de expressie van het *pat* gen.

Voorgaande COGEM adviezen

De COGEM heeft op 15 januari 2003 (CGM/030115-01) positief geadviseerd over een markttoelating voor import en verwerking van deze maïslijn (C/NL/00/10). De COGEM concludeerde in haar advies dat op basis van de informatie in C/NL/00/10 er geen significante potentieel negatieve effecten geïdentificeerd konden worden in relatie tot effecten op mens en milieu.

Aspecten van het gewas

Maïs (*Zea mays* L.) behoort tot de familie van de *Gramineae* en is als landbouwgewas oorspronkelijk afkomstig uit Midden-Amerika. Zoals in een eerder COGEM advies (CGM/030604-01) is vermeld, is maïs overwegend een windbestuiver. Insectenbestuiving speelt bij maïs nauwelijks een rol, maar kan niet volledig worden uitgesloten (1). De levensduur van maïspollen varieert volgens de literatuur van 30 minuten (2) tot 9 dagen (3). Maïs heeft in Europa geen wilde verwanten en slechts in beperkte geografische (warme) gebieden in Europa zijn er mogelijkheden tot verwildering. Opslag van maïsplanten is in Europa zelden van landbouwkundige betekenis, en in Nederland in het geheel niet. Hierbij dient overigens aangetekend te worden dat dit aspect in geval van een extreme klimaatsverandering een rol zou kunnen gaan spelen en het advies zal in dat geval aangepast moeten worden. Aan de hand van praktijkinformatie uit Noord-Amerika zijn er geen redenen om aan te nemen dat de onderhavige modificatie het verwilderingspotentieel van maïs vergroot (4).

Moleculair karakterisatie

Beschrijving van de geïntroduceerde genen

Zoals in een eerder COGEM advies (CGM/030115-01) staat beschreven is door middel van de transformatie van maïs-embryo's met 'particle acceleration' de maïslijn 1507 gemodificeerd met een DNA fragment dat de volgende sequenties bevat:

- *ubiZM1(2)* een ubiquitine promotor van *Zea mays*;
- *cry 1F* een synthetische versie van het getrunceerde *cry1F* gen van *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*;
- ORF25PolyA een terminator van *Agrobacterium tumefaciens* pTi15955;
- CaMV 35 S promotor, 35S promotor van *Cauliflower mosaic virus*;
- *pat* een synthetisch glufosinaat-ammonium tolerantiegen, gebaseerd op het phosphinotricine acetyltransferase gen van *Streptomyces viridochromogenes* stamTü494;
- CaMV 35S terminator, 35S terminator van *Cauliflower mosaic virus*.

Eigenschappen van de geïntroduceerde genen

De tolerantie van maïs tegen insecten is verhoogd, door planten genetisch te modificeren met genen die coderen voor een Bt-toxine. Het binden van deze δ -endotoxinen aan receptoren in de middendarm van insecten, gevolgd door perforering van de darm, zorgt voor de dood van het insect. In onderhavige maïslijn gaat het om het Cry1F toxine, dat toxisch is voor de Europese maïsboorder (*Ostrinia nubilalis*), de Mediterrane maïsboorder (*Sesamia nonagriodes*) en andere insecten uit de orde van de Lepidoptera (motten en vlinders). De schade, veroorzaakt door de maïsboorder, bestaat daaruit dat de larven een gat in de stengel boren en de stengel uithollen, waardoor de stengels plooiën en omvallen.

Daarnaast is de maïslijn 1507 door de expressie van het *pat* gen tolerant voor het herbicide glufosinaat ammonium.

Eigenschappen van het insert

In het insert is een open leesraam geïdentificeerd dat de ORF25PolyA (de terminator van het *cry1F* gen) en de CaMV35S promotor (de promotor van het *pat* gen) overspant. Uit aanvullende informatie, door de aanvrager geleverd, is gebleken dat er geen overeenkomst op eiwitniveau gevonden kan worden met sequenties van bekende toxinen, farmacologische eiwitten, allergenen en coeliaki-gerelateerde (gluten intolerantie) eiwitten. Daarnaast zijn er drie open leesramen gevonden in de flankerende sequenties, waarvan er twee corresponderen met maïs-eigen sequenties en van de andere is bewezen dat deze niet tot expressie komt in de maïslijn.

De stabiliteit van de insertie is bewezen door 1507 maïslijn een aantal malen (vier terugkruisingen) terug te kruisen en vervolgens te testen. Dit maakt de kans op de aanwezigheid van andere inserties die niet gekoppeld zijn zeer klein.

Er is voldoende informatie met betrekking tot de allergeniciteit en toxiciteit. Er worden geen nieuwe allergenen geïntroduceerd door de modificatie en het allergene potentieel (niveau van bepaalde allergene maïscomponenten) wordt niet door de modificatie beïnvloed. Toxiciteitsstudies met ratten laten zien dat er geen bijverschijnselen optreden na toediening van het CRY1F eiwit.

Milieu aspecten

De aanvrager levert een aantal rapporten met de effecten van maïslijn 1507 op niet-doelorganismen. In deze rapporten wordt een vergelijking gemaakt tussen niet-doelorganismen die blootstaan aan het CRY1F eiwit uit pollen en niet-doelorganismen die daar niet aan blootstaan. De COGEM acht deze vergelijking niet voldoende aangezien de niet-doelorganismen in de gangbare landbouwpraktijk blootstaan aan insecticiden (in de landen waar de teelt zal plaatsvinden) en dit zou als controle ook moeten worden meegenomen in de testen.

Geen van de testen met CRY1F eiwit op niet-doelorganismen omvat dosis-response testen. Dosis-response testen zijn noodzakelijk om te bepalen hoe ver de gebruikte dosis afwijkt van de LD 50. LD 50 is de letale dosis voor 50% van de organismen die getest zijn. De dosis response test wordt ook aanbevolen in het rapport van Groot en Dicke (2001)(5).

Sommige van de rapporten (Annex 26 en 27 in de aanvraag; 6 en 7) laten testen zien die met erg weinig individuen (30 tot 75) zijn uitgevoerd, waardoor statistisch verantwoorde conclusies moeilijk te trekken zijn.

Een van de rapporten (Annex 28 in aanvraag; 8) beschrijft de effecten van het CRY1F eiwit op sluipwespen (in dit geval *Nasonia vitripennis*). Bij deze test (Annex 28 in de aanvraag; 8) worden twee concentraties gebruikt. Echter de conclusie van het rapport, dat er geen effect is op sluipwespen, is gebaseerd op de laagste concentratie. De waarnemingen van de hoogste concentratie, die duidelijk wel een effect laten zien, worden niet meegenomen in de conclusie. In een meegeleverd rapport met veldstudies worden sluipwespen ook vermeld. Er is echter geen rekening gehouden met het feit dat sluipwespen maar een zeer korte tijd in het gewas aanwezig zijn als adult (die eieren legt in herbivore insecten) waarna de juveniele sluipwespen onzichtbaar aanwezig zijn in herbivore insecten.

Voor alle rapporten geldt dat de geteste insectenstadia willekeurig gekozen zijn, soms worden larven gebruikt soms adulten. De reden waarom voor larven of adulten wordt gekozen is niet duidelijk. Over het algemeen zijn larven gevoeliger dan adulten, maar in de meeste studies worden adulten getest.

In geen van de studies naar niet-doelorganismen wordt een test uitgevoerd die demonstreert dat met de gebruikte voedingssubstraten ook daadwerkelijk CRY1F toxine door de insecten is opgenomen. Wellicht hebben de insecten de kunstmatige diëten niet geconsumeerd en is het daardoor vanzelfsprekend dat er geen effect gevonden wordt.

Monitoring

De vestigingskansen en de mogelijkheden van maïs tot invasief gedrag in Nederland zijn bijzonder klein. De COGEM wil er echter op wijzen dat Europa in bio-geografisch opzicht veel verschillende gebieden kent hetgeen mede inhoudt dat het ecologisch gedrag van maïs elders in Europa anders kan zijn. Met deze mogelijkheid wordt in de risico-analyse en het monitoringsplan geen rekening gehouden. De COGEM acht het daarom wenselijk dat het monitoringsplan meer gedifferentieerd wordt voor het gebied waar de teelt gaat plaatsvinden. Dit geldt ook voor de effecten op niet-doelorganismen. In het dossier wordt vermeld dat de Lepidoptera die in Europa mogelijke (schadelijke) gevolgen kunnen ondervinden niet goed bekend zijn. Dit betekent dat voor de Europese situatie een base-

line ontbreekt waarmee de effecten op niet-doelorganismen zouden moeten worden vergeleken. Case-specifieke monitoring zou de situatie beter in kaart brengen. Met betrekking tot de 'general surveillance' acht de COGEM de gehele opzet te vrijblijvend. Het is niet duidelijk wie het werk omtrent de effecten op niet-doel organismen uitvoert. Daarnaast worden de boeren, die uiteindelijk de maïs gaan telen aangemoedigd om geobserveerde neveneffecten te melden. De COGEM acht het wenselijk dat waar monitoring belangrijk is, de uitvoering niet afhankelijk moet zijn van de welwillendheid van telers.

Fytosanitaire aspecten

Vooralsnog is het doelorganisme, de Europese maïsboorder, niet van belang voor Nederland. De maïsboorder heeft in de in Nederland overwegende snijmaïssteelt weinig kans, omdat de poppen grotendeels mee worden gehakseld. Bovendien is het klimaat in Nederland niet optimaal voor de Europese maïsboorder.

De Europese maïsboorder is in de Europese Unie een belangrijk plaagorganisme in de landen Frankrijk, Oostenrijk, Duitsland, Italië, Spanje, Griekenland en Portugal. Bij de bestrijding van deze soort is sprake van een aanzienlijk gebruik van gewasbeschermingsmiddelen. Dit gebruik wordt door deze gemodificeerde maïsvariëteit geheel of grotendeels onnodig. Daarmee wordt de kans op aanwezigheid van ongewenste residuen van bestrijdingsmiddelen aanzienlijk verlaagd. Daarnaast merkt de COGEM op dat het effect van 1507 maïs op niet-doelorganismen waarschijnlijk kleiner is dan wanneer een insectenbestrijdingsmiddel zou worden aangewend. Dit hangt samen met het al dan niet voorkomen van het doel-organisme en diens functie in de voedselketen. Voor Nederland is dit echter geen onderwerp van discussie, aangezien de Europese maïsboorder hier niet voorkomt.

Conclusies en Advies

De COGEM acht de risico's voor mens en milieu van teelt, diervoeder toepassingen en verwerking tot industriële producten van maïslijn 1507 verwaarloosbaar klein op basis van de volgende argumenten.

Maïs heeft geen wilde verwanten in Europa en de onderhavige modificatie vergoot niet het verwilderingspotentieel van maïs. De open leesramen die gevonden zijn komen of niet tot expressie of er is gebleken dat ze wanneer ze wel tot expressie komen ze niet overeenkomen met bekende allergenen en toxinen. Er is bewezen door middel van terugkruisingen dat het insert ook in volgende generaties stabiel is. Er is voldoende bewijs geleverd dat er geen nieuwe allergenen of toxische producten gevormd worden als gevolg van de genetische modificatie.

Zowel de studies naar de effecten op niet-doelorganismen als het monitoringsplan hebben niet de kwaliteit die de COGEM wenselijk acht voor een marktintroductie, maar brengen geen risico's voor mens en milieu in Nederland met zich mee. Echter de COGEM merkt op dat de inperking van risico's voor mens en milieu in de Zuid-Europese landen ontoereikend is.

Signalering

De COGEM heeft zorgen over de kwaliteit van de studies die worden uitgevoerd naar de effecten op niet-doelorganismen. De wetenschappelijke kwaliteit van de studies is zeer mager. Daarnaast zijn deze studies niet consistent uitgevoerd en niet toegesneden op de Europese situatie. De COGEM signaleert daarom dat het wenselijk is dat criteria voor dergelijke studies gestandaardiseerd worden. Daarnaast signaleert de COGEM dat in het monitoringplan een beter overzicht van de baseline van de fauna moeten worden gegeven, die ook relevant is voor de teeltgebieden. Het is urgent dat er consensus ontstaat ten aanzien van de aard en detail waarmee deze baseline wordt gegeven. Overigens merkt de COGEM op dat de door de aanvrager gestelde opmerkingen betreffende insecten-resistentie management haars inziens niet correct zijn. Insecten-resistentie management wordt in het dossier volledig gebaseerd op de aanname dat Bt-resistentie in alle gevallen een recessieve eigenschap zou zijn en dat alleen homozygote individuen resistent zouden zijn. Vanuit het oogpunt van de populatiegenetica is dit echter geen logische veronderstelling, omdat bij aanwezigheid van een dominant resistentie-allel in de populatie, deze ogenblikkelijk in frequentie kan toenemen onder selectieve omstandigheden zoals in het onderhavige geval, de aanwezigheid van Bt-toxine. Uit de literatuur blijkt bovendien dat Bt resistentie in de Europese maïsboerder ook gedeeltelijk dominant kan zijn (9). Aangezien insecten-resistentie management leidt tot agronomische risico's, is dit aspect verder niet van belang voor de milieurisicoanalyse.

Referenties

- (1) Hin, C.J.A., 2001. Rapport "Landbouwkundige risico's van uitkruising van GGO-gewassen". Centrum voor Landbouw en Milieu (CLM).
- (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.
- (4) Warwick, S.I., Beckie-Hugh, J., & Small, E., 1999. Transgenic crops: new weed problems for Canada? *Phytoprotection* 80 (2): 71-84.
- (5) Groot, A.T., Dicke M., 2001. Rapport "Transgenic crops in an agro-ecological context: Multitrophic effects of insect-resistant plants.". Wageningen Universiteit.
- (6) Hoxter, K.A, Porch J.R., Krueger H.O. (1999) Rapport "CRY1F *Bacillus thuringiensis* var *aizawai* delta endotoxine: a dietary toxicity studie with green lacewing larvae". Wildlife International Ltd. voor Dow AgroSciences LLC/Mycogen Corporation.
- (7) Hoxter, K.A, Porch J.R, and Krueger H.O. (1999). Rapport "CRY1F *Bacillus thuringiensis* var *aizawai* delta endotoxine: a dietary toxicity studie with the ladybird beetle". Wildlife International Ltd. voor Dow AgroSciences LLC/Mycogen Corporation.
- (8) Hoxter, K.A, Porch J.R, and Krueger H.O. (1999). Rapport "CRY1F *Bacillus thuringiensis* var *aizawai* delta endotoxine: a dietary toxicity studie with parasitic hymenoptera". Wildlife International Ltd. voor Dow AgroSciences LLC/Mycogen Corporation.
- (9) Huang, F., Buschmann L.L., Higgins, R.A., McGaughey, W.H. (1999). Inheritance to *Bacillus thuringiensis* toxin (Dipel ES) in the European corn borer. *Science* Vol. 284 pp. 965-967.