

Advies betreffende: **Aanvullende informatie Marktdossier C/DE/02/09**  
**“Insectresistant maïze MON 863 and MON 863 x MON 810”**

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

COGEM kenmerk  
**CGM/031016-04**

BGGO nummer  
**C/DE/02/09.10**

Datum advies  
**21 oktober**

## **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 marker-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. De COGEM heeft in juni, wegens dezelfde reden, eveneens negatief geadviseerd (CGM/030604-01) over het onderhavige marktdossier. 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. Zoals in een eerder COGEM advies (CGM/030604-01) 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).

## Moleculaire karakterisatie

### *Beschrijving van de geïntroduceerde genen*

Door middel van 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 promotor, 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' terminator, 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 promotor, 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  $\delta$ -endotoxinen aan receptoren in de middendarm van insecten, gevolgd door perforering van de darm, zorgt voor de dood van het insect. Deze aanvraag voor markttoelating betreft 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 betreft het in de hybride maïslijn het Cry1A(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 uit het boren van een gat in de stengel en het uithollen van de stengel door de larven, 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 en de belasting van het milieu 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 'backbone sequenties' als de aanwezigheid van de ingebrachte genen voldoende onderbouwd met behulp van PCR technieken. In het oorspronkelijke ingediende dossier waren twee sequentiebestanden aangeleverd en was niet duidelijk uit welk bestand de sequentie-analyse van de flankerende sequentie aan het 3'einde van het insert in de MON 810 maïslijn afkomstig was. Dientengevolge was niet duidelijk of dit consequenties heeft voor de eerder geleverde bioinformatica analyse. In de aanvullende informatie heeft de aanvrager aangegeven welk sequentiebestand de correcte sequentie weergeeft en dat deze sequentie ook gebruikt is voor de bioinformatica analyse. Derhalve kan geconcludeerd worden dat de eerder aangeleverde bioinformatica analyse correct is uitgevoerd. Daarnaast heeft de aanvrager een artikel (5) ter beschikking gesteld met daarin een bevestiging van de sequentiegegevens.

In het oorspronkelijke dossier ontbraken gegevens omtrent de expressie en stabiliteit van de ingebrachte genen in de F<sub>2</sub> generatie. Deze generatie is met name van belang aangezien dit het plantenmateriaal is dat wordt geconsumeerd. In dit materiaal zal het

hoogste expressieniveau van beide genen (beide homozygoot aanwezig) gevonden worden en zal een uitsplitsing van de twee transgenen gecombineerd worden met een diversificatie van de genetische achtergrond. Twee rapporten met daarin de expressiegegevens van MON863 (6) en MON863 x MON810 (7) maïskorrels zijn aangeleverd. Uit deze gegevens blijkt dat er sprake is van een grote variatie in expressieniveau. De COGEM is van mening dat deze variatie op basis van de genetische achtergrond van de maïslijnen optreedt. Het is het inzicht van de COGEM dat het getoonde expressieniveau geen milieurisico met zich meebrengt en acht hiermee haar eerder gestelde vraag voldoende beantwoordt.

In het vorige dossier ontbrak het rapport waarin de afwezigheid van detecteerbare *ble* translatieproducten in maïs wordt aangetoond. Bij de huidige gegevens is dit rapport (8) wel aangeleverd met daarin de informatie dat met behulp van Western Blotting, expressie van een open leesraam in het insert niet gedetecteerd kon worden. De COGEM is van mening dat hiermee de afwezigheid van het *ble* translatieproduct voldoende is bewezen.

Met betrekking tot de toxiciteitsstudies van het Cry3Bb1 eiwit was in het vorige dossier enige onduidelijkheid in welk organisme het Cry3Bb1 eiwit werd geproduceerd. Uit de gegevens van de aanvrager blijkt dat in de orale toxiciteitsstudie eiwit is gebruikt dat door *E. coli* is geproduceerd (9).

Met betrekking tot de allergeniteit van het Cry3Bb1 eiwit blijkt uit de aanvullende informatie dat het eiwit goed verteerd wordt in het spijsverteringsstelsel van zoogdieren. De COGEM is van mening dat hiermee voldoende is bewezen dat incidentele inname van het Cry3Bb1 eiwit door zoogdieren niet leidt tot allergeniteitsproblemen.

In de door de aanvrager uitgevoerde toxiciteit- en allergie-testen wordt een Cry3Bb1 eiwit gebruikt dat is geproduceerd door *E. coli*, zoals hierboven vermeld en niet door de maïslijn MON 863. In dit dossier is een studie toegevoegd waarin met behulp van massaspectrometrie, N-terminale sequentie analyse, immunoblots, insect bioassays, glycosylatie-analyses en aminozuursamenstelling de equivalentie tussen *E. coli*-geproduceerd eiwit en maïs-geproduceerd eiwit afdoende wordt aangetoond.

#### 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 antibioticumresistentiegenen 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*) is voor het eerst in augustus jl. in Nederland, ten oosten van Schiphol gesignaleerd. 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. 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 in 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 volledig is en acht de risico's bij markttoelating voor mens en milieu verwaarloosbaar klein op basis van de volgende argumenten.

Maïs heeft geen wilde verwanten in Europa en de onderhavige modificatie vergroot niet het verwilderingpotentieel van maïs. Er is bewezen door middel van kruisingen 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. De equivalentie van het door de plant en bacterieel geproduceerde eiwit is op verschillende manieren afdoende aangetoond.

### **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, in tegenstelling tot bij veldproeven niet toegestaan voor marktintroductie.

## Referenties

- (1) C.J.A. Hin. (2001) Landbouwkundige risico's van uitkruising van GGO-gewassen. Rapport van het 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) Hernández, M., Pla, M., Esteve, T, Prat, S., Puigdomènech, P., & Ferrando, A. (2002). A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize Yieldgard<sup>®</sup> based on the 3'-transgene integration sequence. *Transgenic research* PC-1153: 1-11.
- (6) Dudin, Y.A., Tonnu, B., Albee, L.D., and Lirette R.P. (2001) Amended report for MSL 16559: *B.t.* Cry3Bb1.11098 and NPTII protein levels in samples tissue collected from corn event MON863 grown in 1999 field trials. Monsanto Technical Report.
- (7) Dudin, Y.A., Tonnu, B.-P. and Lirette R.P. (2001) Cry3Bb1, Cry1Ab and NPTII protein levels in the dual-trait maize hybrid MON863 x MON810 produced in Argentina field trials conducted during the 1999-2000 growing season. Monsanto Technical Report.
- (8) Silvanovich, A., Karunanandaa, K., Thoma, K., Blasberg J., and Astwood J.D. (2001). The absence of detectable *ble* translation products in corn grain event MON 863. Monsanto Technical Report.
- (9) Pyla, P.D., Kaempfe, T.A., Hileman, R.E., Hammond, B.G., and Astwood, J.D. (2001). Sponsor summary of report for study SB-2001-085 (an acute oral toxicity study in mice with *E.coli*-produced Cry3Bb1 protein (lot 6962478)). Monsanto Technical Report.