

Voorzitter: prof.dr.ir. B.C.J. Zoeteman

Aan de Staatssecretaris van  
Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening  
en Milieubeheer  
De heer drs. P.L.B.A. van Geel  
Postbus 30945  
2500 GX DEN HAAG

Uw kenmerk	Uw brief van	Kenmerk	Datum
C/NL/04/01.06	14 mei 2004	CGM/040527-05	27 mei 2004

Onderwerp  
Aanvullende adviesvragen import van transgene katoenzaden

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van aanvullende adviesvragen van Bureau GGO over een eerder uitgebracht COGEM advies (CGM/040504-01) betreffende het dossier C/NL/04/01 , getiteld 'Import of insect resistant and herbicidetolerant cotton', van DOW Agrosiences Europe, deelt de COGEM u het volgende mee.

### **Samenvatting**


De COGEM stelt in een eerder uitgebracht advies (CGM/0405054-01) dat zij de kans verwaarloosbaar klein acht dat incidenteel morsen van katoenzaden leidt tot verspreiding van katoen in Europa en gaf aan tegen de import van katoenlijn 281-24-236/3006-210-23 geen bezwaar te hebben. De COGEM acht de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Bureau GGO heeft naar aanleiding van dit uitgebrachte advies de COGEM om toelichting verzocht met betrekking tot de moleculaire karakterisering van de genetisch gemodificeerde katoenlijn.

De COGEM is van mening, in lijn met haar eerdere advies, dat de katoenlijn 281-24-236/3006-210-23 voldoende gekarakteriseerd is op stabiliteit en expressie. Daarnaast acht zij dat in voldoende mate is aangetoond dat mogelijke schadelijke effecten op mens en dier, als onderdeel van het milieu, bij incidentele consumptie van het betreffende katoenzaad verwaarloosbaar klein zijn.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'B.C.J. Zoeteman', with a long horizontal stroke extending to the right. A short horizontal line is drawn underneath the signature.

Prof. dr. ir. B.C.J. Zoeteman  
Voorzitter COGEM

c.c. Dr. ir. B.P. Loos  
Dr. I. van der Leij

## **Titel: Moleculaire karakterisatie ten behoeve van import van insectresistente en herbicidentolerante katoen**

**COGEM advies: CGM/040527-05**

### **Inleiding**

Op 4 mei jl. heeft de COGEM advies (CGM/040504-01) uitgebracht betreffende het dossier C/NL/04/01, getiteld 'Import of insect resistant and herbicide tolerant cotton', van Dow Agrosiences Europe. De COGEM is destijds verzocht te adviseren over de import van transgene katoenzaden ten aanzien van de mogelijke risico's voor mens en milieu na eventueel morsen van zaad en de moleculaire karakterisatie van de transgene katoenlijn 281-24-236/3006-210-23.

De COGEM stelt in haar advies dat zij de kans verwaarloosbaar klein acht dat incidenteel morsen van katoenzaden leidt tot verspreiding van genetisch gemodificeerde katoen binnen Europa. Katoen is sterk gedomesticeerd. Intensieve selectie om tot hoge productie te komen heeft ertoe geleid dat de gecultiveerde species niet de eigenschappen bezitten om te verwilderen. Daarnaast komen in Europa geen kruisbare verwanten van katoen voor.

Tevens geeft de COGEM in haar advies aan dat zij van mening is dat de aanvrager gegevens aanlevert waaruit blijkt dat het antibioticumresistentiegen *ery<sup>R</sup>* niet in het genoom van de transgene katoenlijn aanwezig is en dat de katoenlijn voldoende gekarakteriseerd is op stabiliteit, expressie en equivalentie met de niet-transgene ouderlijnen.

Bureau GGO heeft naar aanleiding van dit uitgebrachte advies (CGM/0405054-01) de COGEM om toelichting verzocht met betrekking tot de karakterisering van de genetisch gemodificeerde katoenlijn. Het eerste deel van de vragen die zij stelt aan de COGEM is gericht op de aan- dan wel afwezigheid van ingebrachte (partiële) genen en de expressie van betreffende genen. De overige vragen betreffen de toxiciteit van de Cry eiwitten. De vragen zullen in de volgende paragraaf afzonderlijk worden beantwoord.

### **Overwegingen**

De genetisch gemodificeerde katoenlijn 281-24-236/3006-210-23 is ontstaan door conventionele kruising van twee genetisch gemodificeerde lijnen: lijn 281-24-236 en lijn 3006-210-23. Doordat beide lijnen een *cry* gen bevatten; bezit de kruisingslijn 281-24-236/3006-210-23 twee *cry*-genen, het *cry1Ac* (*synpro*) en het *cry1F* (*synpro*) gen afkomstig van respectievelijk lijn 3006-210-23 en 281-24-236. De *Cry1Ac* en

Cry1F toxinen zijn toxisch voor de belangrijkste belagers van katoen uit de orde van de *Lepidoptera*. Door het inbouwen van *cry* genen wordt de tolerantie van katoen tegen lepidopteren (vlindervleugelen) verhoogd.

Tevens bezit de lijn 281-24-236/3006-210-23 twee volledige *pat* genen en een partieel *pat* gen. Het partieel gen is afkomstig van lijn 281-24-236 die naast een volledig *pat* gen tevens een partieel gen (231 bp in plaats van 304 bp) inclusief promotor, bezit.

Het *pat* gen codeert voor het enzym phosphinotricine-acetyltransferase (PAT). Expressie van dit eiwit resulteert in een tolerantie voor het herbicide ammonium-glufosinaat.

Aangaande de vragen van Bureau GGO omtrent de karakterisatie van de transgene katoenlijn 281-24-236/3006-210-23 antwoordt de COGEM het volgende:

*1. Is de katoenlijn 281-24-236/3006-210-23 in voldoende mate gekarakteriseerd met betrekking tot:*

*- de aanwezigheid en expressie van de ingebrachte genen;*

Zoals aangegeven in haar vorige advies is de COGEM van mening dat de aanwezigheid en expressie van de ingebrachte genen *cry1F*, *cry1Ac* en *pat* in voldoende mate zijn gekarakteriseerd.

Analyses (Southern blot) uitgevoerd met specifieke probes gericht tegen het *cry1F* en het *cry1Ac* gen tonen aan dat van beide *cry* genen slechts één kopie aanwezig is in de katoenlijn 281-24-236/3006-210-23. Gegevens afkomstig van hybridisatie-experimenten (Southern blot) met katoenlijn 281-24-236/3006-210-23 en een specifieke probe gericht tegen het *pat* gen komen overeen met de data voor de oorspronkelijke lijnen. Hiermee wordt aangetoond dat, naast de intacte kopieën van elke uitgangslijn, een extra partieel fragment afkomstig van lijn 281-24-236 aanwezig is in katoenlijn 281-24-236/3006-210-23.

Door met behulp van ELISA-methoden de hoeveelheid geproduceerde Cry en Pat eiwitten te bepalen werd aangetoond dat de *cry1F*, *cry1Ac* en de intacte *pat* genen tot expressie komen in katoenzaad van de lijn 281-24-236/3006-210-23.

*- de afwezigheid van sequenties van de vector backbone, zoals het erythromycine resistentie gen;*

Zoals aangegeven in haar vorige advies is de COGEM van mening dat de gegevens aangeleverd door de aanvrager aantonen dat in de katoenlijn 281-24-236/3006-210-23 het *ery<sup>R</sup>*-gen niet aanwezig is. Hybridisatie-experimenten (Southern blot) met een specifieke probe gericht tegen het *ery<sup>R</sup>* gen tonen de afwezigheid in desbetreffende katoenlijn aan. Tevens acht de COGEM het voldoende aannemelijk dat vectorbackbonesequenties afwezig zijn.

*- de aanwezigheid van het extra fragment van het pat gen en mogelijke expressie hiervan?*

De aanvrager levert gegevens aan waaruit blijkt dat, hoewel zeer beperkt wel expressie van het partiële *pat* gen plaatsvindt, de aanwezigheid van het partiële *pat* gen niet leidt tot een detecteerbare hoeveelheid eiwit in de plant op Western blot. De COGEM is van mening dat de aanwezigheid van het partiële *pat* gen geen risico's voor mens en milieu met zich meebrengt. Daarbij wijst de COGEM erop dat het hier import en geen teelt van katoenzaden betreft en dat katoen zich niet kan vestigen in Europa.

*2. Zijn de microbiel geproduceerde Cry eiwitten, die zijn gebruikt in de acute toxiciteitstesten, equivalent aan de Cry eiwitten zoals door de plant geproduceerd?*

De COGEM onderkent het probleem van equivalentie. Het is op generlei wijze mogelijk te bewijzen dat bacterie- en plantgeproduceerde eiwitten identiek zijn, maar gezien de benodigde hoeveelheden eiwit voor toxiciteitstesten is productie in bacteriën noodzakelijk. De COGEM acht dat er in voldoende mate is aangetoond dat de Cry1F en Cry1Ac eiwitten, geproduceerd door de plant biochemisch en functioneel equivalent zijn aan de toxines geproduceerd door de bacterie *Pseudomonas fluorescens*. De toxische werking van de eiwitten in relatie tot doelorganismen wordt als vergelijkbaar beschouwd, evenals de biochemische karakterisatie waarbij gekeken werd naar het moleculair gewicht, de immunoreactiviteit, glycosylatie en het bepalen van de sequentie en lokalisatie van de eiwitten met behulp van de MALDI-TOF MS.

*3. Zijn er mogelijk schadelijke effecten te verwachten als gevolg van de gelijktijdige expressie van twee Cry eiwitten in de kruisingslijn?*

In de katoenlijn 281-24-236/3006-210-23 komen twee Cry eiwitten tot expressie, CryF en Cry1Ac. Deze eiwitten onderscheiden zich van elkaar in hun toxiciteit ten opzichte van doelorganismen. Planten van katoenlijn 281-24-236/3006-210 zijn hierdoor resistent tegen een breder spectrum aan doelorganismen dan katoenlijnen voorzien van de afzonderlijke *cry* genen. De COGEM is van mening dat er geen aanwijzing is dat gelijktijdige aanwezigheid van de Cry1Ac en Cry1F eiwitten effecten tot gevolg heeft, anders dan die verwacht op basis van de aanwezigheid van beide Cry eiwitten. Daarbij wijkt de totale hoeveelheid Cry eiwit in het de katoenlijn voorzien van beide *cry* genen niet significant af van de katoenlijn voorzien van een enkel *cry* gen.

*4. Zijn de testen die zijn uitgevoerd om de acute toxiciteit te bepalen voldoende?*

De COGEM is van mening dat in voldoende mate is aangetoond dat inname van de Cry eiwitten niet tot acute toxiciteit leidt. Muizen die hoge concentraties Cry eiwitten kregen toegediend vertoonden binnen twee weken na opname geen afwijkende gedrag en geen uiterlijke verschillen in vergelijking met muizen die deze Cry eiwitten niet ontvingen. Tevens is voldoende aangetoond dat zowel Cry1F als Cry1Ac eiwitten in maagsappen instabiel zijn. De eiwitten werden in minder dan een minuut afgebroken.

## **Advies**

De COGEM is van mening, in lijn met haar eerdere advies dat de katoenlijn 281-24-236/3006-210-23 voldoende gekarakteriseerd is op stabiliteit en expressie. Daarnaast acht zij dat in voldoende mate is aangetoond dat mogelijke schadelijke effecten op mens en dier, als onderdeel van het milieu, bij incidentele consumptie van het betreffende katoenzaad verwaarloosbaar klein zijn. De COGEM benadrukt dat onderhavige adviesvraag de milieurisicobeoordeling van import van transgene katoenzaden betreft en gezien het feit dat morsen van katoenzaden niet leidt tot verspreiding van katoen, de kans op mogelijke effecten op mens en dier sowieso zeer beperkt blijft.