



COMMISSIE
COGEM
GENETISCHE
MODIFICATIE

COGEM ADVIES

CGM/170907-01

BEORDELEN VAN RISICO'S VOOR NIET-DOELWITORGANISMEN BIJ TEELT VAN GG-GEWASSEN MET ÉÉN OF MEERDERE BT-TOXINES






Colofon

Ontwerp: Avant la lettre, Utrecht

© COGEM 2017

Delen uit deze publicatie mogen voor niet-commerciële doeleinden worden overgenomen op voorwaarde van bronvermelding: Commissie Genetische Modificatie (COGEM), 2017. Beoordelen van risico's voor niet-doelwitorganismen bij teelt van gg-gewassen met één of meerdere Bt-toxines. COGEM advies CGM/170907-01.

De COGEM heeft tot taak de regering te adviseren over de risicoaspecten van genetisch gemodificeerde organismen en te signaleren over ethische en maatschappelijke aspecten van genetische modificatie (Wet milieubeheer §2.3).



Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw S.A.M. Dijkma
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 7 september 2017
KENMERK CGM/170907-01
ONDERWERP Advies "Beoordelen van risico's voor niet-doelwitorganismen bij teelt van gg-gewassen met één of meerdere Bt-toxines"

Geachte mevrouw Dijkma,

Hierbij bied ik u een advies aan dat een leidraad biedt voor het beoordelen van risico's van de teelt van insectenresistente genetisch gemodificeerde (gg-) gewassen met één of meerdere Bt-toxines.

SAMENVATTING

Wanneer een vergunning voor de teelt van een genetisch gemodificeerd (gg-) gewas wordt aangevraagd, moet worden beoordeeld of dit gg-gewas een effect op zogenaamde niet-doelwitorganismen zou kunnen hebben. Niet-doelwitorganismen zijn alle organismen die in het veld voorkomen, met uitzondering van het plaagorganisme waartegen de ingebrachte eigenschap in het gg-gewas is gericht. Wanneer het aannemelijk is dat de werking van een ingebracht gen een nadelig effect op niet-doelwitorganismen kan hebben, moet informatie worden aangeleverd om eventuele risico's voor deze organismen te kunnen beoordelen.

Om resistentie tegen plaaginsecten te verkrijgen, worden in gg-gewassen genen ingebouwd, die afkomstig zijn van de bacterie *Bacillus thuringiensis* en coderen voor Bt-toxines. Steeds vaker worden in een gg-gewas meerdere genen ingebouwd die coderen voor verschillende Bt-toxines. Dit roept nieuwe vragen op voor de risicobeoordeling bij vergunningaanvragen voor teelt, omdat mogelijk synergisme kan optreden tussen de Bt-toxines waardoor (niet-doelwit) organismen die niet vatbaar zijn voor de individuele Bt-toxines, mogelijk wel vatbaar zijn voor de gecombineerde toxines.

Om informatie te verkrijgen over het voorkomen van synergisme tussen de vele verschillende Bt-toxines heeft de COGEM ter voorbereiding van dit advies, literatuuronderzoek laten uitvoeren en samen met internationale zusterorganisaties een wetenschappelijk symposium over dit onderwerp georganiseerd. Op basis van de hiermee verkregen inzichten geeft de COGEM in dit advies een leidraad voor het beoordelen van risico's voor niet-doelwitorganismen bij teelt van gg-gewassen die meerdere Bt-toxines tot expressie brengen.

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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke, characteristic of the signature of Prof. dr. ing. Sybe Schaap.

Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM



INHOUDSOPGAVE

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | Inleiding | 7 |
| 2. | Bt-toxines en hun werkingsmechanisme | 9 |
| 2.1 | Werkingsmechanisme | 9 |
| 2.2 | Verschillende groepen Bt-toxines | 9 |
| 2.3 | Specificiteit van 3-domein Cry eiwitten | 10 |
| 2.4 | Conclusies | 10 |
| 3. | Interacties tussen Bt-toxines | 12 |
| 3.1 | Mogelijkheden voor interacties bij mengsels van stoffen | 12 |
| 3.2 | Mogelijke gevolgen van interacties tussen Bt-toxines voor de risicobeoordeling | 12 |
| 3.3 | Onderzoek naar interacties tussen Bt-toxines | 13 |
| 3.4 | Interacties bij de verschillende groepen Bt-toxines | 13 |
| 3.5 | Effect van mengsels van Bt-toxines werkzaam tegen verschillende insectenordes | 15 |
| 3.6 | Effect van mengsels van Bt-toxines op verschillende organismen | 16 |
| 3.7 | Conclusies | 16 |
| 4. | Leidraad voor de beoordeling van effecten op niet-doelwitorganismen | 17 |
| 4.1 | Alleen onderzoek bij mogelijk nadelig effect | 17 |
| 4.2 | Werkingspectrum moet zijn bepaald | 17 |
| 4.3 | Laboratoriumonderzoek vormt eerste stap | 17 |
| 4.3.1 | <i>Selectie van niet-doelwitorganismen</i> | 18 |
| 4.3.2 | <i>Blootstelling van niet-doelwitorganismen</i> | 18 |
| 4.3.3 | <i>Kwaliteitseisen voor laboratoriumonderzoek</i> | 20 |
| 4.3.4 | <i>Onderzoek naar de groeisnelheid van een populatie</i> | 20 |
| 4.4 | Geen effect: vervolgonderzoek niet nodig | 20 |
| 4.4.1 | <i>Ongerichte veldproeven ongeschikt voor de milieurisicobeoordeling</i> | 21 |
| 4.5 | Wel een effect: veldproeven de tweede stap | 21 |
| 4.5.1 | <i>Veldproeven moeten aangepast worden aan het betreffende niet-doelwitorganisme</i> | 22 |
| 4.5.2 | <i>Veldproeven met het betreffende gg-gewas</i> | 22 |
| 4.5.3 | <i>Veldproeven in Europese teeltgebieden volgens gangbare teeltpraktijk</i> | 22 |
| 4.5.4 | <i>Onderbouwing van statistische analyse</i> | 23 |
| 4.6 | Voorkeur voor experimentele studies | 23 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 5. | Leidraad voor de milieurisicobeoordeling van gg-gewassen die meerdere Bt-toxines tot expressie brengen | 24 |
| 5.1 | Rekening houden met mogelijke interacties | 24 |
| 5.1.1 | <i>COGEM advies: Onderzoek naar effecten van mogelijke interacties toespitsen op soorten van dezelfde orde</i> | 27 |
| 5.2 | Additionele aandachtspunten | 28 |
| 5.2.1 | <i>Onderzoek naar interacties met 10x de verwachte blootstellingsconcentratie</i> | 28 |
| 5.2.2 | <i>Soms moeten ook de risico's van subcombinaties beoordeeld worden</i> | 28 |
| 5.2.3 | <i>Altijd rekening houden met mogelijke additieve effecten</i> | 28 |
| 5.3 | General surveillance als noodzakelijke complementerende maatregel | 29 |
| 6. | Samenvatting van de belangrijkste uitgangspunten voor de beoordeling van risico's voor niet-doelwitorganismen | 30 |
| | Referenties | 32 |



1

INLEIDING

Landbouwgewassen die door middel van genetische modificatie resistent zijn gemaakt tegen plaaginsecten, hebben meestal één of meerdere Bt-genen. Deze Bt-genen zijn afkomstig van de bacterie *Bacillus thuringiensis* (Bt) en coderen voor Bt-toxines die toxisch zijn voor bepaalde (plaag)insecten. Er zijn meerdere Bt-toxines bekend die een verschillende specificiteit hebben voor verschillende soorten insecten.

Bij een vergunningaanvraag voor teelt van een Bt-gewas is het beoordelen van eventuele risico's voor andere organismen (de zogenaamde niet-doelwitorganismen) dan het plaaginsect (het doelorganisme) een belangrijk onderdeel van de milieurisicobeoordeling. De laatste jaren is het aantal genetisch gemodificeerde (gg-) gewassen, waarin meerdere Bt-genen zijn ingebouwd, sterk toegenomen. Inbouw van meerdere Bt-genen in een plant vindt plaats om resistentie tegen verschillende plaaginsecten te verkrijgen of voor een effectievere bestrijding van één plaaginsect.

Er is veel ervaring met het bestuderen van mogelijke effecten op niet-doelwitorganismen bij gg-gewassen die één Bt-toxine produceren. De COGEM heeft in het verleden verschillende onderzoeksprojecten laten uitvoeren naar de methodologie van de milieurisicobeoordeling en in adviezen aanbevelingen gedaan om deze te verbeteren.^{1,2,3,4} Ook heeft de COGEM samen met de European Food Safety Authority (EFSA) een symposium hierover georganiseerd.⁵ De resulterende door de COGEM gehanteerde uitgangspunten worden samengevat in hoofdstuk 4.

De productie van meerdere Bt-toxines in één gg-gewas roept nieuwe vragen op voor de risicobeoordeling. Het is bekend dat toxines door onderlinge interacties elkaars werking kunnen beïnvloeden. Daardoor is het in principe mogelijk dat de werking van een Bt-toxine verandert wanneer het gg-gewas ook een ander Bt-toxine tot expressie brengt. Hierdoor zouden organismen die geen nadelig effect ondervinden van de afzonderlijke Bt-toxines, mogelijk wel een nadelig effect kunnen ondervinden van een combinatie van Bt-toxines.

Zowel over de vraag wanneer er onderzoek uitgevoerd moet worden naar de mogelijke risico's voor niet-doelwitorganismen ten gevolge van interacties tussen verschillende Bt-toxines bij gg-gewassen met meerdere Bt-toxines, alsmede over de te volgen onderzoeksmethodiek, bestaat nog veel discussie. Zowel vanuit de wetenschap als het bedrijfsleven zijn hiervoor uiteenlopende voorstellen gedaan. Soms wordt gesteld dat onderzoek naar interacties altijd nodig is.^{6,8,10} Terwijl anderen van mening zijn dat der-

gelijke studies alleen noodzakelijk zijn wanneer het gg-gewas meerdere Bt-toxines produceert met effecten op dezelfde insectenorde.

Ook zijn er verschillende inzichten over de organismen waar dit onderzoek mee uitgevoerd zou moeten worden. Sommigen vinden dat voor dit onderzoek gevoelige plaagorganismen gebruikt moeten worden,^{6,7,8} terwijl anderen van mening zijn dat onderzoek met plaagorganismen weinig voorspellende waarde heeft⁹ en stellen dat dergelijke studies met niet-doelwitorganismen uitgevoerd zouden moeten worden.¹⁰ Verder zijn sommigen van mening dat studies met niet-doelwitorganismen altijd nodig zijn,¹⁰ terwijl anderen stellen dat studies met niet-doelwitorganismen alleen uitgevoerd hoeven te worden wanneer er niet-doelwitorganismen zijn die behoren tot een insectenorde waar meerdere door het gg-gewas geproduceerde Bt-toxines een effect op hebben, en weer anderen vinden dat dergelijke studies alleen noodzakelijk zijn bij niet-doelwitorganismen die een effect van tenminste één van de Bt-toxines ondervinden.⁹

Door het in werking treden van de nieuwe nationale teeltbevoegdheid (Richtlijn 2015/412) is het mogelijk dat het aantal vergunningaanvragen in de Europese Unie (EU) voor de teelt van gg-gewassen weer zal gaan stijgen. Er zijn in de EU geen vergunningaanvragen voor de teelt van gg-gewassen met meerdere Bt-toxines in behandeling, maar mogelijke toekomstige vergunningaanvragen zullen hoogstwaarschijnlijk gg-gewassen betreffen die meerdere Bt-toxines produceren. Kennis over mogelijke interacties tussen Bt-toxines is van belang bij het beoordelen van eventuele risico's voor niet-doelwitorganismen van dergelijke gg-gewassen.

De COGEM heeft met het oog op toekomstige vergunningaanvragen onderzoek laten uitvoeren om de huidige kennis over de werking van Bt-toxines en interacties tussen Bt-toxines in kaart te brengen.^{11,12,13,14} Op basis van de resultaten van deze onderzoeksprojecten (samengevat in hoofdstuk 2 en 3) en een internationale workshop die de COGEM met zusterorganisaties uit het Verenigd Koninkrijk, België en Spanje heeft georganiseerd,¹⁵ geeft de COGEM in dit advies een leidraad voor het beoordelen van milieurisico's van gg-gewassen die meerdere Bt-toxines tot expressie brengen.



2

BT-TOXINES EN HUN WERKINGSMECHANISME



2.1 WERKINGSMECHANISME

De bacterie *Bacillus thuringiensis* produceert van nature eiwitten die toxisch zijn voor andere organismen, met name voor insecten en nematoden. Deze Bt-eiwitten zijn niet direct toxisch maar worden dit pas wanneer zij door proteases^a in de middendarm van gevoelige insecten of nematoden zijn omgezet in een actief δ -endotoxine. De omzetting naar een actief δ -endotoxine in de middendarm is een belangrijke factor voor de specificiteit van Bt-toxines. In dit rapport wordt de term 'Bt-toxine' gebruikt voor zowel het inactieve Bt-eiwit als het actieve δ -endotoxine.

De Bt-toxine-genen in gg-gewassen zijn zodanig aangepast dat zij in een plant optimaal tot expressie komen. De door gg-gewassen tot expressie gebrachte Bt-toxines missen een deel van beide (C- en N-terminale) uiteinden die niet noodzakelijk zijn voor de insecticidale werking, maar moeten nog steeds door proteases in de middendarm geactiveerd worden. De aminozuurvolgorde^b van de door gg-gewassen geproduceerde Bt-toxines verschilt vaak van de door *B. thuringiensis* geproduceerde Bt-toxines. De volgorde is veranderd zodat het Bt-toxine beter tot expressie komt in planten, al bij kleinere hoeveelheden toxisch is of tegen meerdere plaaginsecten werkt.

Hoewel bekend is dat Bt-toxines gevoelige insecten of nematoden doden, is het precieze werkingsmechanisme nog niet opgehelderd. Er bestaan verschillende theorieën.¹¹ Volgens één van de theorieën worden na binding van een Bt-toxine aan een receptor op de celmembraan van middendarmcellen poriën gevormd, waardoor het membraan doorlaatbaar wordt en de darmcel afsterft. Volgens een andere theorie vormt de darmcel na binding blaasjes ('blebbing'), waarna de cel opzwellt en afsterft.



2.2 VERSCHILLENDE GROEPEN BT-TOXINES

Op basis van de structuur van het eiwit kunnen Bt-toxines in een aantal groepen worden verdeeld. Zo zijn onder meer '3-domein Cry', 'Bin', 'Mtx', 'Vip' en 'Cyt' groepen te onderscheiden.

a Enzymen die eiwitten afbreken.

b Eiwitten zijn opgebouwd uit aminozuren waarvan de volgorde door het DNA bepaald wordt.

De naamgeving van Bt-toxines is niet gebaseerd op de eiwitstructuur, maar op het feit of het toxine in de bacteriespore of tijdens de groeifase van de bacterie aanwezig is, of op de functie van het eiwit. De namen van Bt-toxines komen daardoor niet altijd overeen met de groepen die op basis van de structuur van de verschillende eiwitten worden onderscheiden. Drie van de hierboven genoemde Bt-toxinegroepen (3-domein Cry, Bin en Mtx) worden allemaal 'Cry eiwitten' genoemd, omdat zij als eiwitkristallen ('crystals') in de sporen van *B. thuringiensis* voorkomen.

De Cyt eiwitten behoren in tegenstelling tot de 'Cry eiwitten' wel allemaal tot dezelfde eiwitstructuur-groep. Zij worden net als de Cry eiwitten in de sporen van de bacterie geproduceerd en zijn cytolytisch, ze zorgen ervoor dat cellen openbarsten. Ook de Vip eiwitten hebben onderling een vergelijkbare eiwitstructuur. Zij worden in de groeifase van *B. thuringiensis* geproduceerd ('vegetative induced protein').

Het merendeel van de Bt-eiwitten die door gg-gewassen worden geproduceerd, behoort tot de zogeheten 3-domein Cry eiwitten. Daarnaast zijn er enkele gg-gewassen die Bin (i.e. Cry35) en Vip eiwitten produceren.¹⁶

2.3 SPECIFICITEIT VAN 3-DOMEIN CRY EIWITTEN

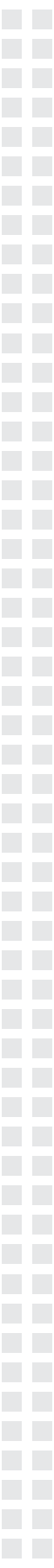
Voorheen werd verondersteld dat Bt-toxines specifiek toxisch zijn voor bepaalde groepen insecten. De 3-domein Cry eiwitten zijn op basis hiervan in verschillende subgroepen ingedeeld:

- Cry1 eiwitten toxisch voor vlinders en motten (Lepidoptera);
- Cry3 eiwitten toxisch voor kevers (Coleoptera);
- Cry4 eiwitten toxisch voor vliegen en muggen (Diptera);
- Cry2 eiwitten toxisch voor zowel vlinders, motten en kevers (Lepidoptera en Coleoptera).

De laatste jaren is duidelijk geworden dat Bt-toxines ook voor andere dan de hierboven genoemde groepen toxisch kunnen zijn. Een derde van de Bt-toxines waarvan het effect in meerdere groepen insecten (ordes) is onderzocht, blijkt (hoewel in mindere mate) ook toxisch voor insecten uit een andere orde of blijkt zelfs toxisch voor organismen die tot een ander fyllum (i.e. Nematoda) behoren.^{17,18} Dit betekent dat de eerdere aannames over de specificiteit niet correct zijn en de werkingsspectra van de toxines breder kunnen zijn dan vaak wordt verondersteld.

2.4 CONCLUSIES

- Bij gevoelige insecten of nematoden binden Bt-toxines aan receptoren op de celmembraan van darmcellen, waarna de darmcellen afsterven en het insect of de nematode doodgaat.

- 
- Er is onvoldoende bekend over het werkingsmechanisme van Bt-toxines om op basis daarvan te kunnen voorspellen of Bt-toxines elkaars werking kunnen beïnvloeden.
 - Op basis van hun eiwitstructuur kunnen Bt-toxines in verschillende groepen worden verdeeld (o.a. de 3-domein Cry, de Bin, Vip, Mtx en Cyt eiwitgroepen).
 - De naamgeving van Bt-toxines is niet gerelateerd aan de eiwitstructuur.
 - Bt-toxines kunnen toxisch zijn voor meerdere taxonomische groepen, dat wil zeggen voor meerdere insectenordes en/of nematoden.



3

INTERACTIES TUSSEN BT-TOXINES



3.1 MOGELIJKHEDEN VOOR INTERACTIES BIJ MENGSELS VAN STOFFEN

Wanneer organismen tegelijk aan meerdere stoffen worden blootgesteld, kunnen deze stoffen elkaars werking beïnvloeden. Wanneer één van beide stoffen een effect heeft, kan het effect van deze stof vergroot worden door de aanwezigheid van een andere stof die zelf geen effect heeft (bijv. $1 + 0 > 1$). Er wordt dan gesproken van potentiatie.

Wanneer beide stoffen afzonderlijk een effect hebben, kan er bij een mengsel van deze stoffen sprake zijn van een additief, synergistisch of antagonistisch effect. Bij een additief effect komt het effect van het mengsel overeen met de opgetelde effecten van de verschillende stoffen in het mengsel ($1 + 1 = 2$). Het verwachte additieve effect dient als referentie om te bepalen of er sprake is van interacties. Het verschil tussen het (bij additiviteit) verwachte en het waargenomen effect wordt weergegeven in de synergiefactor. Een synergiefactor van 1 komt overeen met additiviteit. Bij een effect dat groter is dan op grond van additiviteit wordt verwacht (bijv. $1 + 1 > 2$), wordt gesproken van synergisme. De synergiefactor is dan groter dan 1. Bij een effect dat kleiner is dan bij additiviteit wordt verwacht (bijv. $1 + 1 < 2$), wordt gesproken van antagonisme. De synergiefactor ligt dan tussen de 0 en 1.

Een uitgebreidere uitleg over additiviteit, antagonisme of synergisme en de manier waarop dit wordt onderzocht, is te vinden in de COGEM onderzoeksrapporten CGM 2014-02 en CGM 2014-05.^{11,12}



3.2 MOGELIJKE GEVOLGEN VAN INTERACTIES TUSSEN BT-TOXINES VOOR DE RISICOBEOORDELING

De meeste studies naar mogelijke effecten op niet-doelwitorganismen die in het kader van vergunningaanvragen worden gedaan, worden uitgevoerd met één Bt-toxine. Wanneer het gg-gewas verschillende Bt-toxines bevat en deze Bt-toxines elkaars werking versterken (synergisme), kan een niet-doelwitorganisme al bij lagere hoeveelheden een effect ondervinden dan op basis van studies met afzonderlijke Bt-toxines wordt verwacht. Indien er sprake is van synergisme kan hierdoor het risico voor niet-doelwitorganismen worden onderschat.

3.3 ONDERZOEK NAAR INTERACTIES TUSSEN BT-TOXINES

Er zijn verschillende studies uitgevoerd naar de effecten van mengsels van Bt-toxines. Deze studies zijn vrijwel allemaal uitgevoerd met gevoelige (plaag)organismen en betreffen, op een enkele uitzondering na, mengsels van Bt-toxines die werkzaam zijn tegen soorten uit dezelfde insectenorde. In de meeste gevallen wordt het effect onderzocht volgens de door Tabashnik beschreven methode, waarbij de Bt-toxines in een bepaalde verhouding worden gemengd en de totale hoeveelheid Bt-toxines in het mengsel gelijk blijft.¹⁹

3.4 INTERACTIES BIJ DE VERSCHILLENDE GROEPEN BT-TOXINES

Uit de beschikbare literatuur blijkt dat Bt-toxines elkaars werking kunnen beïnvloeden. Van vrijwel alle eiwitgroepen binnen de Bt-toxines (nl. de 3-domein Cry, Vip, Bin, Mtx en Cyt eiwitgroepen) zijn er gevallen bekend waarbij mengsels van Bt-toxines elkaars werking beïnvloeden.^{11,12,10}

Uit een onderzoek dat de COGEM heeft laten uitvoeren, blijkt dat in ongeveer de helft van de in de wetenschappelijke literatuur beschreven experimenten (53%) waarin het effect van een mengsel van Bt-toxines werd onderzocht, sprake is van synergisme. De mate van synergie varieerde van zwak (synergiefactor tussen 2 en 10) tot zeer sterk (synergiefactor meer dan 50). In 18% van de experimenten was de synergiefactor hoger dan 10. In een klein aantal experimenten (7%) was sprake van antagonisme (synergiefactor lager dan 0,5).¹¹ In het algemeen wordt gesteld dat gemeten synergiefactoren tussen 0,5 en 2 onvoldoende verschillend zijn van een additief effect om tot een biologisch significant verschillend effect te kunnen leiden.²⁰

Er dient te worden opgemerkt dat bij vrijwel alle experimenten gevoelige plaagorganismen zijn gebruikt. Hieruit kunnen niet per definitie conclusies getrokken worden over de effecten van Bt-toxine mengsels op niet-doelwitorganismen. Een deel van de experimenten is daarnaast uitgevoerd met (subgroepen van) plaagorganismen die eerder resistent waren geworden voor één van de Bt-toxines in het mengsel. Zeer hoge synergiefactoren (>50) werden voornamelijk gevonden bij experimenten met dergelijke resistente plaagorganismen.¹¹ Waarschijnlijk zijn de hoge synergiefactoren een gevolg van het doorbreken van de resistentie voor het ene Bt-toxine door de aanwezigheid van het andere Bt-toxine in het mengsel, met als gevolg een terugval naar de oorspronkelijke gevoeligheid van het insect voor het betreffende Bt-toxine. Het is daardoor sterk de vraag of de gevonden hoge synergiefactoren indicatief zijn voor situaties waarbij geen resistentie is verworven.

- **3-domein Cry eiwitten**

Het merendeel van het gepubliceerde onderzoek betreft experimenten met mengsels van twee eiwitten uit de zogeheten 3-domein Cry eiwitgroep. In de literatuur is in totaal voor 83 verschillende combinaties van plaagorganismen en 3-domein Cry eiwitmengsels (werkzaam tegen dezelfde insectenorde) onderzocht of de 3-domein Cry eiwitten elkaars werking beïnvloeden.^{11,8,21,22} Er blijkt een grote variatie te bestaan in de mate waarin de verschillende 3-domein Cry eiwitten elkaars werking kunnen versterken (synergie) of verzwakken (antagonisme). Bij vier combinaties werd een synergiefactor hoger dan 10 gerapporteerd. Bij vijf combinaties lag de synergiefactor tussen de 5 en 10.¹¹ De maximale synergiefactor die is gerapporteerd, was 26.²³

Naast het hierboven beschreven onderzoek met mengsels van twee 3-domein Cry eiwitten, is er een beperkt aantal experimenten uitgevoerd met een mengsel met drie 3-domein Cry eiwitten. Bij deze experimenten werd afhankelijk van het onderzochte organisme een additief, licht synergistisch of licht antagonistisch effect gevonden (synergiefactor van 0,4 tot 5,1).^{19,24}

- **Cyt eiwitten**

In de literatuur zijn ook een aantal experimenten beschreven met een combinatie van een 3-domein Cry eiwit en een Cyt eiwit. In 5 van de 16 onderzochte combinaties werd een synergiefactor hoger dan 5 waargenomen, waarbij bij 3 combinaties de synergiefactor hoger was dan 10. De maximale gerapporteerde synergiefactor was 33.^{22,25}

Er zijn naast experimenten met een mengsel met één 3-domein Cry eiwit en één Cyt eiwit, ook enkele experimenten uitgevoerd naar het effect van twee 3-domein Cry eiwitten en één Cyt eiwit. Bij deze experimenten werd een licht synergistisch effect waargenomen (synergiefactor 2,6).^{26,27} Bij een mengsel van vier 3-domein Cry eiwitten en één Cyt eiwit werd een synergiefactor van 4,1 gevonden.²²

- **Vip eiwitten**

In de literatuur zijn een aantal studies gepubliceerd waarbij het effect van een Vip eiwit en een ander Bt-toxine is onderzocht. Bij een Vip en een 3-domein Cry eiwitmengsel werd in zeven van de 18 onderzochte combinaties van Bt-toxines en plaagorganismen een antagonistisch effect gevonden. Bij vier van de onderzochte combinaties waren er aanwijzingen voor een synergistisch effect. Bij twee van de onderzochte combinaties werd een synergiefactor gevonden die hoger was dan 5. De maximale synergiefactor was 14,3.²⁸ Ook bij een combinatie van een Vip eiwit en een Cyt eiwit waren er aanwijzingen voor synergie. Hierbij werd een maximale synergiefactor van 4,3 gevonden.²⁹

Naast experimenten met een mengsel met één 3-domein Cry en één Vip eiwit, zijn er ook enkele experimenten uitgevoerd waarbij is onderzocht wat het effect was van een combinatie van twee 3-domein Cry eiwitten en één Vip eiwit. Bij deze experimenten werd geen antagonisme of synergie waargenomen.^{8,30}

- **Mtx eiwitten**

Het merendeel van de gepubliceerde experimenten met combinaties van Bt-toxines met minimaal één Mtx eiwit, is uitgevoerd met resistente plaagorganismen. Uit deze studies komt het beeld naar voren dat Mtx eiwitten de werking van andere Bt-toxines in hoge mate kunnen versterken. Bij een gevoelig organisme werd een maximale synergiefactor van 120 gevonden. Bij een resistent plaagorganisme werd maximaal een synergiefactor van 135 gevonden.^{11,31}

- **Bin eiwitten**

Bin eiwitten zijn Bt-toxines die afzonderlijk niet of nauwelijks toxisch zijn, maar die in combinatie met een ander Bt-eiwit wel toxisch zijn. Aangezien de twee eiwitten altijd samen voorkomen in de bacterie, kan gesteld worden dat het feitelijke toxine uit twee eiwitten bestaat. Er is slechts een klein aantal Bin eiwitten bekend. Omdat Bin eiwitten afzonderlijk niet of nauwelijks toxisch zijn, vertonen ze allemaal een sterk 'synergistisch' effect wanneer zij gecombineerd worden met hun 'conjugatieve pair'.

3.5 EFFECT VAN MENGSELS VAN BT-TOXINES WERKZAAM TEGEN VERSCHILLENDE INSECTENORDES

Bij de hierboven beschreven experimenten zijn Bt-toxines gecombineerd die een effect hebben op dezelfde groep insecten (orde). In een gg-gewas kunnen ook Bt-toxines worden gecombineerd die een primair effect hebben op verschillende insectenordes. Er zijn slechts vijf studies naar mogelijke interacties uitgevoerd met dergelijke mengsels van Bt-toxines.¹² Bij de experimenten in vier van deze studies werd een 3-domein Cry eiwit dat een effect heeft op Lepidoptera gecombineerd met een 3-domein Cry eiwit dat een effect op Coleoptera heeft. Bij een andere studie werden experimenten uitgevoerd waarbij twee 3-domein Cry eiwitten die een effect op Coleoptera hebben, werden gecombineerd met twee 3-domein Cry en een Vip eiwit met een effect op Lepidoptera.⁸ Bij geen van de uitgevoerde experimenten werden interacties waargenomen.

Hoewel er geen gevallen bekend zijn waarbij 3-domein Cry eiwitten die toxisch zijn voor verschillende insectenordes elkaars werking beïnvloeden, kan er vanwege het geringe aantal studies niet met zekerheid geconcludeerd worden dat interacties tussen dergelijke 3-domein Cry eiwitten niet mogelijk zijn.

3.6 EFFECT VAN MENGSELS VAN BT-TOXINES OP VERSCHILLENDE ORGANISMEN

Er is een aantal publicaties waarbij het effect van hetzelfde mengsel van Bt-toxines (o.a. combinaties van 3-domein Cry eiwitten, Mtx eiwitten, en 3-domein Cry eiwitten met een Vip eiwit⁸) op verschillende gevoelige soorten insecten (hoofdzakelijk plaagorganismen) is onderzocht. Het effect van de Cry1Ab-Cry1Ac combinatie werd onderzocht voor verschillende Lepidoptera en was antagonistisch bij de Plakker (*Lymantria dispar*), additief bij de Katoendaguil (*Helicoverpa armigera*) en de zijdevlinder (*Bombyx mori*), en synergistisch bij de stengelboorder (*Chilo partellus*).^{12,21} Ook bij de Cry1Aa-Cry1Ac combinatie bleek de manier waarop de Bt-toxines elkaars werking beïnvloeden per soort te verschillen.^{12,21} Ook bij combinaties van een 3-domein Cry met een Vip eiwit (Cry1C-Vip3Aa) bleek de interactie tussen de Bt-toxines afhankelijk van het onderzochte organisme.²⁸ Hetzelfde mengsel kan dus bij het ene organisme een additief, maar bij een ander organisme een antagonistisch of synergistisch effect hebben.^{9,12,21}

3.7 CONCLUSIES

- Vrijwel al het onderzoek naar het effect van mengsels van Bt-toxines is uitgevoerd met gevoelige (plaag)organismen. Er is nauwelijks onderzoek uitgevoerd met mengsels van Bt-toxines bij niet-doelwitorganismen.
- Bij vrijwel alle Bt-toxinegroepen (nl. de 3-domein Cry, Vip, Bin, Mtx en Cyt eiwitgroepen) zijn er Bt-toxines beschreven die in een mengsel met een ander Bt-toxine elkaars werking beïnvloeden.
- Wanneer Bin eiwitten met hun 'conjugative partner' worden gecombineerd, wordt de werking van beide eiwitten versterkt.
- Mengsels van 3-domein Cry eiwitten, 3-domein Cry eiwitten in combinatie met Cyt, Vip of Mtx eiwitten, en mengsels van Mtx eiwitten kunnen elkaars werking beïnvloeden als ze werkzaam zijn tegen dezelfde groep insecten (orde). Er wordt vaker een versterkende werking (synergistisch effect) dan een verzwakkende werking (antagonistisch effect) gerapporteerd.
- Er is weinig onderzoek uitgevoerd met mengsels van Bt-toxines die werkzaam zijn tegen verschillende insectenordes. Hierbij werd geen interactie waargenomen.
- Eenzelfde eiwitmengsel kan afhankelijk van het organisme elkaars effect versterken, verzwakken of geen invloed op elkaars effect hebben.



4

LEIDRAAD VOOR DE BEOORDELING VAN EFFECTEN OP NIET-DOELWITORGANISMEN

Bij een aanvraag voor teelt van een gg-gewas beoordeelt de COGEM mogelijke effecten voor niet-doelwitorganismen. Daarvoor heeft ze eerder de volgende uitgangspunten geformuleerd:^{1,2,4}



4.1 ALLEEN ONDERZOEK BIJ MOGELIJK NADELIG EFFECT

Onderzoek naar eventuele effecten op niet-doelwitorganismen is alleen nodig wanneer het aannemelijk is dat de werking van het ingebrachte gen een nadelig effect op niet-doelwitorganismen kan hebben.² Dit is bijvoorbeeld het geval bij gg-gewassen die Bt-toxines produceren. Onderzoek naar effecten op niet-doelwitorganismen is daarentegen niet nodig bij gg-gewassen met herbicidentolerantie(s).^c



4.2 WERKINGSPECTRUM MOET ZIJN BEPAALD

Bij gg-gewassen die een Bt-toxine produceren, moet het werkingsspectrum van dit Bt-toxine zijn bepaald. Bt-toxines kunnen effecten hebben op meerdere insectenordes.^{9,12,17,18,10} Het is niet uitgesloten dat een Bt-toxine een effect heeft op organismen die behoren tot een andere taxonomische groep dan het plaaginsect waar het Bt-toxine tegen gericht is. Om informatie over het werkingsspectrum te verkrijgen, moet het effect van het Bt-toxine zijn onderzocht met organismen uit verschillende taxonomische groepen, zoals insecten (Coleoptera, Neuroptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Diptera, etc.), springstaarten (Collembola), spinnen (Arachnida) en nematoden (Nematoda).



4.3 LABORATORIUMONDERZOEK VORMT EERSTE STAP

Om informatie te verkrijgen voor het beoordelen van eventuele risico's voor niet-doelwitorganismen worden allereerst laboratoriumexperimenten uitgevoerd. In het

^c Bij deze gewassen is een gen ingebracht waardoor de plant ongevoelig is voor bepaalde onkruidbestrijdingsmiddelen. Het genproduct heeft geen invloed op de overleving van insecten.

laboratorium wordt voor verschillende niet-doelwitorganismen onderzocht of zij een nadelig effect van de ingebrachte genen in het gg-gewas ondervinden.

4.3.1 SELECTIE VAN NIET-DOELWITORGANISMEN

De niet-doelwitorganismen die worden onderzocht, moeten zo representatief mogelijk zijn voor alle niet-doelwitorganismen die in het veld kunnen worden blootgesteld aan het betreffende gg-gewas. Er zijn talloze verschillende niet-doelwitorganismen die in een gewas voorkomen. Het is daardoor onmogelijk om voor alle niet-doelwitorganismen die aan het gg-gewas worden blootgesteld, te onderzoeken of zij een effect ondervinden. Daarom moet een beperkt aantal representatieve soorten onderzocht worden.³² Door de COGEM is een aantal gedetailleerde criteria geïdentificeerd waaraan de te onderzoeken niet-doelwitorganismen moeten voldoen.

- In het laboratorium wordt voor minimaal vijf soorten niet-doelwitorganismen onderzocht of zij een nadelig effect ondervinden van het gg-gewas. Zij worden hierbij blootgesteld aan plantmateriaal van het gg-gewas of aan het door het gg-gewas geproduceerde gezuiverde eiwit. Als dit laatste niet mogelijk is, kan wanneer aan bepaalde voorwaarden wordt voldaan, microbiel geproduceerd eiwit worden gebruikt.
- De niet-doelwitorganismen zijn afkomstig uit verschillende ecologische groepen, namelijk predatoren, parasitoïden (sluipwespen), bestuivers en detritivoren.^{2,33}
- Eén van de onderzochte niet-doelwitorganismen behoort tot de insectenorde waar het eiwit tegen werkzaam is.³⁴ Wanneer het eiwit werkzaam is tegen meerdere insectenordes worden niet-doelwitorganismen uit al deze insectenordes onderzocht.
- Wanneer er een reden is om een effect op een zeldzame of een met uitsterven bedreigde soort te verwachten, wordt ook het effect op deze soort onderzocht.²
- De geteste niet-doelwitorganismen komen in Nederland of Europa in het betreffende gewas voor, of behoren tot hetzelfde geslacht als deze niet-doelwitorganismen.^{4,35}
- Daarnaast voldoen de onderzochte soorten aan één of meer van de volgende criteria:²
 - mogelijk zeer gevoelig voor het betreffende eiwit óf mogelijk blootgesteld aan hoge concentraties van het betreffende eiwit wanneer het gg-gewas wordt geteeld;
 - van ecologisch of economisch belang;
 - representatief voor grotere groepen.

4.3.2 BLOOTSTELLING VAN NIET-DOELWITORGANISMEN

Tijdens de laboratoriumexperimenten moeten de niet-doelwitorganismen aan tenminste twee verschillende hoeveelheden Bt-toxines worden blootgesteld, zodat de dosis afhankelijkheid kan worden vastgesteld.³⁶

Eén van deze hoeveelheden moet overeenkomen met de maximale hoeveelheid Bt-toxine waar het niet-doelwitorganisme in het veld aan blootgesteld zal worden.^{32,36} Kennis over de manier en mate van blootstelling van het niet-doelwitorganisme is noodzakelijk om te kunnen bepalen welke hoeveelheid overeenkomt met de maximale hoeveelheid waar het niet-doelwitorganisme in het veld aan kan worden blootgesteld.

Daarnaast moet het niet-doelwitorganisme worden blootgesteld aan een grotere hoeveelheid Bt-toxine (10x de verwachte maximale blootstellingsconcentratie). Een veiligheidsmarge is noodzakelijk omdat het onderzochte niet-doelwitorganisme mogelijk minder gevoelig is voor het Bt-toxine dan de andere in het veld aanwezige niet-doelwitorganismen. Ook is het mogelijk dat het gg-gewas onder bepaalde omstandigheden meer Bt-toxine produceert. De expressie van Bt-toxines is namelijk mede afhankelijk van de groeiomstandigheden en het ontwikkelingsstadium van een plant.⁴¹

De COGEM wijst erop dat de maximale concentratie waar een niet-doelwitorganisme aan blootgesteld kan worden, niet altijd overeenkomt met de maximale concentratie van het Bt-toxine in plantmateriaal (bijv. in bladeren of pollen). Wanneer een Bt-toxine in een prooidier accumuleert kunnen predatoren in het veld aan hogere concentraties worden blootgesteld. De COGEM is van mening dat bij het bepalen van de maximale blootstellingsconcentratie ook rekening gehouden moet worden met mogelijke accumulatie van Bt-toxines.³⁷ Daarom is inzicht in of onderzoek naar de mate van accumulatie van Bt-toxines noodzakelijk bij de bepaling van eventuele effecten op predatoren en parasitoïden.

Idealiter worden de niet-doelwitorganismen bij de laboratoriumexperimenten blootgesteld aan plantmateriaal van het betreffende gg-gewas. De insecten moeten echter aan verschillende hoeveelheden toxines worden blootgesteld en in de praktijk blijkt het vaak niet mogelijk om plantmateriaal met voldoende Bt-toxine te verkrijgen om het effect van 10x de verwachte maximale blootstellingsconcentratie te kunnen onderzoeken. Ook zijn er veel niet-doelwitorganismen, zoals predatoren en parasitoïden, die in het veld indirect via hun prooidieren of gastheren aan de Bt-toxines worden blootgesteld en nauwelijks plantmateriaal eten. Mede daarom heeft het de voorkeur om deze niet-doelwitorganismen aan uit plantmateriaal gezuiverde Bt-toxines bloot te stellen. Het zuiveren van eiwitten uit plantmateriaal is vaak echter niet mogelijk of problematisch, waardoor het niet lukt om voldoende door planten geproduceerd Bt-toxine te verkrijgen voor de laboratoriumexperimenten.

Wanneer het gen in een bacterie tot expressie wordt gebracht, kan wel voldoende Bt-toxine worden verkregen. Als een bacterie het Bt-toxine produceert, is het - bijvoorbeeld door verschillen in eiwitvouwing of glycosylering - mogelijk dat het eiwit enigszins verschilt van het Bt-toxine dat door het gg-gewas wordt geproduceerd. Wanneer overtuigend is aangetoond dat de biologische activiteit van het betreffende eiwit overeenkomt met het eiwit dat door het gg-gewas wordt geproduceerd, is naar inzien van de COGEM, het gebruik van door bacteriën geproduceerd gezuiverd eiwit acceptabel.^{38,39,40}

4.3.3 KWALITEITSEISEN VOOR LABORATORIUMONDERZOEK

De laboratoriumexperimenten moeten verder voldoen aan de volgende kwaliteitseisen:

- Een positieve en een negatieve controle dienen aanwezig te zijn. De mortaliteit in de negatieve controle groep is lager dan 15%.³⁹
- De concentratie van het betreffende Bt-toxine moet geverifieerd worden.³⁶
- De activiteit van het Bt-toxine moet zijn aangetoond⁴¹ en mag tijdens het experiment niet sterk afnemen.³⁶
- Er moet zijn aangetoond dat het Bt-toxine door het niet-doelwitorganisme wordt opgenomen.^{41,36}
- Het onderzoek is uitgevoerd met een voldoende aantal herhalingen. Voor het detecteren van biologisch significante effecten is het in de meeste gevallen voldoende wanneer een effect grootte van 30-50% met een onderscheidend vermogen ('statistical power') van minimaal 80% kan worden aangetoond.⁴²
- Er moet een correcte statistische analyse worden uitgevoerd. De keuze voor de gebruikte statistische analysemethode dient te worden verklaard. Daarnaast moeten de P-waarde, de grootte van het waargenomen verschil, de effectgrootte waarop getoetst is, het aantal herhalingen, de gemiddelden van de verschillende groepen, de standaardafwijking en het betrouwbaarheidsinterval worden vermeld.^{39,43}

4.3.4 ONDERZOEK NAAR DE GROEISNELHEID VAN EEN POPULATIE

Bij laboratoriumexperimenten wordt de letaliteit van een Bt-toxine onderzocht, maar blijven andere (subletale) factoren die voor de overleving van een soort van belang zijn, in de praktijk vaak buiten beschouwing.¹⁰ Subletale effecten die de fitness van een organisme verminderen, kunnen echter grote gevolgen hebben voor de uiteindelijke overleving van organismen en het voortbestaan van populaties. Subletale effecten zijn onder meer een verminderd gewicht, een verandering van gedrag, een verminderd aantal nakomelingen, een veranderde generatietijd, etc. De groeisnelheid van een populatie is daarom een betere, ecologisch relevantere indicator voor eventuele effecten op niet-doelwitorganismen.⁴⁴

4.4 GEEN EFFECT: VERVOLGONDERZOEK NIET NODIG

Als er geen effect wordt gedetecteerd bij het laboratoriumonderzoek dat met 10x de verwachte maximale blootstellingsconcentratie is uitgevoerd bij niet-doelwitorganismen die voldoen aan de gestelde criteria, is de COGEM van oordeel dat verder onderzoek niet uitgevoerd hoeft te worden. De 10x veiligheidsmarge is gebaseerd op de huidige wetenschappelijke inzichten over verschillen in de gevoeligheid van orga-

nismen en kennis over de praktische uitvoerbaarheid van blootstellingsexperimenten met grote hoeveelheden eiwitten.

Zoals eerder vermeld zijn in het veld talloze verschillende niet-doelwitorganismen aanwezig, die mogelijk gevoeliger zijn voor het Bt-toxine dan het onderzochte niet-doelwitorganisme. Wanneer het onderzochte niet-doelwitorganisme bij de veiligheidsmarge van 10x de verwachte maximale blootstellingsconcentratie geen effect ondervindt, acht de COGEM het voldoende aannemelijk dat het gg-gewas ook voor andere niet-onderzochte niet-doelwitorganismen geen risico zal opleveren. De COGEM is zich er echter van bewust dat de grens van 10x arbitrair is gekozen en wijst mede daarom op het belang van 'general surveillance'.^d

4.4.1 ONGERICHTE VELDPROEVEN ONGESCHIKT VOOR DE MILIEURISICOBEOORDELING

Naast laboratoriumonderzoek, kunnen veldproeven met een gg-gewas noodzakelijk zijn om de mogelijke effecten in de praktijksituatie te onderzoeken. Als er bij het laboratoriumonderzoek effecten zijn gevonden, zal gericht onderzocht moeten worden of het nadelige effect ook onder veldomstandigheden optreedt en wat de effectgrootte is. De EFSA stelt dat veldproeven in het kader van de milieurisicobeoordeling uitgevoerd moeten worden om eventuele onverwachte effecten van een gg-gewas op te kunnen merken.⁴⁵ Wanneer een veldproef wordt uitgevoerd zonder hypothese ten aanzien van een mogelijk specifiek effect, kan worden gesproken van een ongerichte veldproef.

Uit onderzoek dat in opdracht van de COGEM is uitgevoerd, blijkt dat ongerichte veldproeven alleen zeer grote effecten kunnen detecteren.⁴⁶ Dergelijke effecten zullen bij insectenresistente gewassen al in het voorafgaande laboratoriumonderzoek worden opgemerkt. De COGEM is daarom van mening dat de ongerichte veldproeven die op dit moment voor elke vergunningaanvraag worden uitgevoerd, niet tot nauwelijks informatie opleveren die bruikbaar is voor de risicobeoordeling en derhalve achterwege kunnen blijven.

4.5 WEL EEN EFFECT: VELDPROEVEN DE TWEEDE STAP

Wanneer uit het laboratoriumonderzoek blijkt dat het gg-plantmateriaal of het Bt-toxine een effect op één of meerdere niet-doelwitorganismen heeft, is dit een aanwijzing dat deze en soortgelijke niet-doelwitorganismen in het veld een effect zouden kunnen ondervinden. Om te kunnen beoordelen of dit het geval is, moet allereerst inzicht worden verkregen in de concentraties waarbij een effect optreedt.

^d General Surveillance is de Europese verplichting om o.a. bij de teelt van gg-gewassen te monitoren op het optreden van onverwachte nadelige effecten.

Daarnaast moet onderzocht worden of het effect ook in het veld optreedt⁴⁴ en of andere niet-doelwitorganismen die tot dezelfde groep behoren ook een effect onder- vinden. De omstandigheden (temperatuur, blootstelling etc.) in het veld zijn variabel en verschillen van de gestandaardiseerde omstandigheden in een laboratorium. Het niet-doelwitorganisme maakt in het veld bovendien onderdeel uit van het ecosysteem en dient als voedsel voor andere organismen. Hierdoor is het mogelijk dat een in het laboratorium gedetecteerd effect in het veld geen gevolgen heeft voor de populatie niet-doelwitorganismen.

4.5.1 VELDPROEVEN MOETEN AANGEPAST WORDEN AAN HET BETREFFENDE NIET-DOELWITORGANISME

Om een effect te kunnen detecteren en een betrouwbare causaliteit te kunnen vast- stellen, moeten er in een veldproef voldoende niet-doelwitorganismen worden aan- getroffen. Vrijwel alle soorten niet-doelwitorganismen zijn zeer mobiel, komen in het veld soms slechts in kleine aantallen voor of fluctueren van nature sterk in aantal. Om ervoor te zorgen dat bij de veldproef voldoende niet-doelwitorganismen worden gevonden om effecten te kunnen detecteren, moeten de opzet en methodologie van de veldproef aangepast worden aan het te onderzoeken niet-doelwitorganisme.

4.5.2 VELDPROEVEN MET HET BETREFFENDE GG-GEWAS

Om te bepalen of niet-doelwitorganismen in het veld een effect ondervinden, is het belangrijk dat de veldproef wordt uitgevoerd met het gg-gewas waar de vergunning voor is aangevraagd. Wanneer een ander gg-gewas wordt gebruikt dat (ook) andere eigenschappen heeft, of andere inhoudsstoffen tot expressie brengt, kunnen effecten mogelijk gemaskeerd of versterkt worden. Veldproeven moeten daarom worden uit- gevoerd met de betreffende gg-lijn en niet met ouder- of kruisingslijnen.^{40,39}

Alleen wanneer de eigenschappen die een effect op niet-doelwitorganismen zouden kunnen hebben volledig overeenkomen, is een uitzondering mogelijk. Dit is bijvoor- beeld het geval wanneer een gg-gewas dezelfde Bt-toxines in eenzelfde hoeveelheid produceert én eventuele andere ingebrachte eigenschappen (bijvoorbeeld herbici- dentolerantie) zelf geen effect op niet-doelwitorganismen hebben en ook de werking van de Bt-toxines niet beïnvloeden.

4.5.3 VELDPROEVEN IN EUROPESE TEELTGEBIEDEN VOLGENS GANGBARE TEELTPRAKTIJK

Veldproeven dienen te worden uitgevoerd in relevante agrarische gebieden in Europa. Er bestaan verschillen tussen de soorten niet-doelwitorganismen die in Europa voor-

komen en de niet-doelwitorganismen die buiten Europa (bijvoorbeeld Noord- of Zuid-Amerika) voorkomen. Veldproeven die in andere gebieden zijn uitgevoerd, acht de COGEM daarom niet geschikt voor het beoordelen van eventuele risico's voor Europese niet-doelwitorganismen.⁴⁷

De omstandigheden waaronder een veldproef wordt gehouden, moeten verder overeenkomen met de gangbare landbouwpraktijk. Zo moet een veldproef in het juiste teeltseizoen worden uitgevoerd, omdat de (relevante levensstadia van de) niet-doelwitorganismen die normaal gesproken in het veld voorkomen anders mogelijk niet aanwezig zijn.^{40,48}

4.5.4 ONDERBOUWING VAN STATISTISCHE ANALYSE

Er dient een onderbouwing aanwezig te zijn voor de gebruikte statistische analysemethode. Wanneer er relatief vaak lage aantallen organismen zijn waargenomen, dient hier bij de statistische analyse rekening mee gehouden te worden.⁴⁹

4.6 VORKEUR VOOR EXPERIMENTELE STUDIES

Sommige niet-doelwitorganismen (zoals vlinders en bijen) komen in veldproeven in dusdanig lage aantallen voor, dat het niet of nauwelijks mogelijk is om een effect te detecteren. Daarom wordt soms gebruik gemaakt van rekenmodellen (bijv. theoretische blootstellingsanalyses) om effecten op deze niet-doelwitorganismen in te kunnen schatten.⁵⁰ Bij modellen worden vaak aannames gedaan, schattingen gemaakt en worden gegevens van andere organismen gebruikt (extrapolatie). Hierdoor kunnen fouten geïntroduceerd worden.⁵¹ De COGEM heeft daarom bij de beoordeling van eventuele effecten op niet-doelwitorganismen een sterke voorkeur voor experimentele gegevens die bijvoorbeeld door laboratoriumonderzoek verkregen kunnen worden. Modellen kunnen alleen gebruikt worden als zij gevalideerd zijn en er voldoende betrouwbare experimentele gegevens beschikbaar zijn die als input voor het model kunnen dienen.



5

LEIDRAAD VOOR DE MILIEURISICOBEOORDELING VAN GG-GEWASSEN DIE MEERDERE BT-TOXINES TOT EXPRESSIE BRENGEN



5.1 REKENING HOUDEN MET MOGELIJKE INTERACTIES

Bij gg-gewassen met meerdere Bt-toxines moet in de milieurisicobeoordeling, naast de punten die in de leidraad van Hoofdstuk 4 worden beschreven, rekening gehouden worden met mogelijke interacties tussen de Bt-toxines en de effecten daarvan op niet-doelwitorganismen.

Zoals in hoofdstuk 3 is beschreven, kunnen combinaties van Bt-toxines (3-domein Cry eiwitten, 3-domein Cry eiwitten in combinatie met Cyt, Vip of Mtx eiwitten, Bin eiwitten en mengsels van Mtx eiwitten) die werkzaam zijn tegen dezelfde insectenorde, elkaars werking versterken. Er zijn geen gevallen bekend waarbij Bt-toxines die werkzaam zijn tegen verschillende insectenordes elkaars werking beïnvloeden. Door het geringe aantal studies met dergelijke combinaties van Bt-toxines blijft er echter enige onzekerheid bestaan of Bt-toxines die werkzaam zijn tegen verschillende insectenordes elkaars werking zouden kunnen beïnvloeden.

In de risicobeoordeling moet met mogelijke interacties tussen Bt-toxines rekening worden gehouden. Op basis van de huidige kennis is echter niet op voorhand te voorspellen of een bepaalde combinatie van Bt-toxines elkaars werking beïnvloedt. Dit moet daarom experimenteel worden onderzocht. Een complicerende factor daarbij is dat dezelfde combinatie van Bt-toxines, afhankelijk van het organisme, elkaars effect kan versterken of verzwakken. Het is echter in de praktijk niet haalbaar om voor de talloze mogelijke niet-doelwitorganismen het effect van een bepaalde combinatie te onderzoeken. Daarom moet een methode gekozen worden waarmee zoveel mogelijk relevante en representatieve informatie verkregen wordt. Hieronder worden verschillende opties en de bijbehorende aandachtspunten genoemd:



■ ■ Optie 1: Onderzoek met gevoelige (plaag)organismen naar optreden van interacties

De aanpak die thans door de meeste vergunningaanvragers gevolgd wordt, is om met bekende gevoelige (plaag)organismen te onderzoeken of er interactie is tussen de Bt-toxines die het gg-gewas produceert. De veronderstelling hierbij is dat het gemakkelijker is om een verandering in de werking van de Bt-toxines waar te nemen wanneer het organisme al een effect ondervindt van tenminste één van de Bt-toxines.

Vervolgonderzoek naar het effect van de combinatie van Bt-toxines op niet-doelwitorganismen vindt vervolgens alleen plaats als er bij het experiment met de gevoelige organismen interactie is waargenomen. In dat geval wordt het effect van de gecombineerde Bt-toxines op de gebruikelijke set niet-doelwitorganismen onderzocht.

Bij deze optie worden er op basis van experimenten met gevoelige (plaag)organismen conclusies getrokken over het al dan niet voorkomen van interacties bij andere (niet-doelwit)organismen die ongevoelig zijn voor de afzonderlijke Bt-toxines. De manier waarop Bt-toxines elkaars werking beïnvloeden, kan per organisme verschillen, waardoor onderzoek met gevoelige (plaag)organismen nauwelijks voorspellende waarde heeft met betrekking tot het voorkomen van interacties bij andere (niet-doelwit)organismen.

■ ■ Optie 2: Onderzoek met de gebruikelijke set niet-doelwitorganismen

In laboratoriumexperimenten kan met de gebruikelijke selectie van minimaal vijf niet-doelwitorganismen onderzocht worden of de Bt-toxines elkaars werking kunnen veranderen. De gebruikelijke selectie van vijf niet-doelwitorganismen bestaat uit organismen uit verschillende ordes. Tot nu toe is er alleen interactie waargenomen, wanneer 3-domein Cry eiwitten werden gecombineerd die werkzaam waren tegen insecten uit dezelfde insectenorde. Het lijkt uitzonderlijk dat gecombineerde Bt-eiwitten een effect hebben op insecten uit andere insectenordes.⁹ Daarom is het de vraag of bij onderzoek met niet-doelwitorganismen de toevoeging van insecten uit andere insectenordes dan de orde(s) waarvan bekend is dat de betreffende Bt-toxines er tegen werkzaam zijn, zinvol is. De COGEM is van mening dat de kans dat een combinatie van Bt-eiwitten als gevolg van interacties juist een effect heeft op geteste insecten uit andere insectenordes, als zeer klein tot verwaarloosbaar kan worden beschouwd.

■ ■ Optie 3: Onderzoek toespitsen op bepaalde groep van niet-doelwitorganismen

Omdat interacties alleen zijn waargenomen bij organismen die behoren tot de insectenorde waar meerdere Bt-toxines in het mengsel tegen werkzaam zijn, is een verster-

kende werking bij niet-doelwitorganismen die tot dezelfde insectenorde behoren het meest waarschijnlijk. Een andere optie is daarom om het onderzoek toe te spitsen op deze niet-doelwitorganismen.

Daartoe moet bij deze optie eerst het volledige werkingspectrum van de verschillende Bt-toxines die door het gg-gewas worden geproduceerd bekend zijn en moet dus voldaan zijn aan de in 4.2 geformuleerde voorwaarde. Daarna dient er te worden bepaald of er meerdere Bt-toxines zijn die een effect hebben op dezelfde insectenorde. Vervolgens moet bekeken worden of er niet-doelwitorganismen uit deze insectenorde in het veld of in de naburige omgeving voorkomen. Hiervoor kan gebruik worden gemaakt van de database met in verschillende gewassen aangetroffen geleedpotigen, die in opdracht van de EFSA is samengesteld.^{52,53} Wanneer dergelijke niet-doelwitorganismen aanwezig zijn, wordt voor deze niet-doelwitorganismen onderzocht of zij een effect ondervinden van een mengsel dat bestaat uit de in het gewas ingebouwde Bt-toxines die tegen deze insectenorde werken (zie ook 5.2.1). Indien dit het geval is, moet onderzocht worden of de gevonden effectgrootte relevant is onder veldomstandigheden.

Wanneer er geen niet-doelwitorganismen uit de betreffende insectenorde in het veld van het gg-gewas of de naburige omgeving aanwezig zijn, is verder onderzoek niet nodig.

Opgemerkt moet worden dat het merendeel van de beschikbare wetenschappelijke gegevens onderzoek betreft dat is uitgevoerd met combinaties van 3-domein Cry eiwitten. Er is minder onderzoek uitgevoerd naar het voorkomen van interacties bij mengsels met Bt-toxines uit andere Bt-eiwitgroepen. Er zijn aanwijzingen dat interacties bij dergelijke mengsels mogelijk vaker optreden. Hoewel deze optie voldoende informatie lijkt te bieden om risico's van gg-gewassen met verschillende 3-domein Cry eiwitten in te kunnen schatten, is het daarom de vraag of dit ook het geval is voor gg-gewassen met andere Bt-toxines.

Optie 4: Modelmatige berekeningen van worst-case scenario's

Een vierde optie is om een modelmatige berekening uit te voeren naar wat in het ergste geval ('worst-case scenario') het effect van de combinatie van Bt-toxines op een niet-doelwitorganisme zou kunnen zijn. Daarbij wordt uitgegaan van het maximale bekende expressieniveau in het gg-gewas, een theoretische maximale blootstelling (rekening houdende met de Bt-concentratie in plantmateriaal of prooidieren en met de inname van het betreffende niet-doelwitorganisme) aan de verschillende Bt-toxines, een maximaal versterkend effect en een extreem gevoelig niet-doelwitorganisme. Vervolgens kan bij de risicobeoordeling rekening worden gehouden met dit 'worst-case' effect.

Een nadeel van theoretische analyses en modelmatige berekeningen is dat hierbij aannames worden gedaan, schattingen worden gemaakt en gegevens van andere organismen worden gebruikt (extrapolatie) waardoor fouten geïntroduceerd kunnen worden.

5.1.1 COGEM ADVIES: ONDERZOEK NAAR EFFECTEN VAN MOGELIJKE INTERACTIES TOESPITSEN OP SOORTEN VAN DEZELFDE ORDE

Uit de voorgaande paragraaf blijkt dat er meerdere opties zijn om mogelijke effecten te onderzoeken, maar dat bij alle opties kanttekeningen te plaatsen zijn. Geen van de opties kan volledig uitsluitel geven of er mogelijke nadelige effecten op niet-doelwitorganismen zullen optreden door synergisme tussen de in het gg-gewas ingebouwde Bt-toxines. Dit is echter inherent aan de milieुरisicobeoordeling. Ook bij het onderzoek naar mogelijke effecten van één ingebouwd Bt-toxine, is de gevolgde werkwijze van het testen op minimaal 5 verschillende niet-doelwitsoorten geen garantie voor het detecteren van alle mogelijke nadelige effecten.

Gezocht wordt naar een onderzoeksmethode waarmee de kans dat een mogelijk nadelig effect wordt onderkend het grootst is, die voldoende representatief en indicatief is voor de situatie in het veld en die in praktische zin uitvoerbaar en haalbaar is.

Gezien deze eisen en de voor- en nadelen van de verschillende genoemde opties, adviseert de COGEM om bij een gg-gewas waarin meerdere 3-domein Cry eiwitten ingebouwd zijn, de aanpak te volgen die geschetst is onder optie 3 waarbij het onderzoek op een bepaalde groep niet-doelwitorganismen wordt toegespitst.

Daarnaast zouden eventuele risico's ook met behulp van modelmatige 'worst-case scenario's' (optie 4) beoordeeld kunnen worden. De COGEM merkt op dat een modelmatige berekening alleen uitgevoerd kan worden als er goede experimentele gegevens aan ten grondslag liggen. Deze lijken echter in veel gevallen te ontbreken. Mede daarom is het van belang dat voldoende hoge veiligheidsmarges worden gebruikt. In de wetenschappelijke literatuur werd bij één combinatie van Bt-toxines een synergiefactor van 33 gevonden. De COGEM is op basis van de huidige kennis daarom van mening dat bij de berekening van het 'worst-case scenario' een minimale veiligheidsfactor van 35 keer gebruikt zou moeten worden om voldoende rekening te houden met eventuele synergie.

Bij mengsels met andere dan 3-domein Cry eiwitten, lijkt synergisme vaker voor te komen. Er is echter minder onderzoek gedaan met dergelijke mengsels, waardoor er minder goed bepaald kan worden wanneer interacties zouden kunnen optreden. Bij gg-gewassen met meerdere Bt-toxines en minimaal één Bt-toxine dat niet tot de 3-domein Cry eiwitten behoort, adviseert de COGEM daarom om met de gebruikelijke set van niet-doelwitorganismen het effect van het mengsel van Bt-toxines te onderzoeken (optie 1).

5.2 ADDITIONELE AANDACHTSPUNTEN

5.2.1 ONDERZOEK NAAR INTERACTIES MET 10X DE VERWACHTE BLOOTSTELLINGSCONCENTRATIE

Indien onderzoek met een mengsel van Bt-toxines noodzakelijk is, moet het niet-doelwitorganisme worden blootgesteld aan een mengsel van Bt-toxines, waarin de verschillende Bt-toxines aanwezig zijn in 10x de maximale verwachte blootstellingsconcentratie. De verhouding van de Bt-toxines in het mengsel moet overeenkomen met de verhouding waarin het niet-doelwitorganisme aan de Bt-toxines wordt blootgesteld.

Hoewel er in de wetenschappelijke literatuur situaties zijn beschreven waarbij afhankelijk van de verhouding van Bt-toxines in een mengsel interactie wel of juist niet optrad, is het in praktische zin niet haalbaar om onderzoek uit te voeren met allerlei verschillende verhoudingen, omdat het aantal te testen combinaties exponentieel toeneemt. De COGEM sluit zich daarom aan bij de in de toxicologie gangbare aanpak die ook gevolgd wordt bij onderzoek naar effecten van enkele Bt-toxines, waarbij twee verschillende concentraties (de blootstellingconcentratie in het veld en een 10x hogere concentratie) worden getest.

5.2.2 SOMS MOETEN OOK DE RISICO'S VAN SUBCOMBINATIES BEOORDEELD WORDEN

De COGEM merkt op dat eventuele nakomelingen van een gg-gewas een andere combinatie van Bt-toxines zouden kunnen bevatten, omdat eigenschappen in een volgende generatie uit kunnen splitsen. Dit is een complicerende factor bij het beoordelen van eventuele effecten op niet-doelwitorganismen. In dat geval moet namelijk voor elk van de mogelijke Bt-toxine combinaties beoordeeld worden of deze een effect op niet-doelwitorganismen zouden kunnen hebben. Het is afhankelijk van het gg-gewas of ook de risico's van subcombinaties beoordeeld moeten worden.

Wanneer een gg-gewas bijvoorbeeld drie verschillende Bt-toxines (A, B en C) produceert die allen tegen dezelfde insectenorde werkzaam zijn, en er in de volgende generatie nakomelingen zijn die slechts twee van deze Bt-toxines bevatten, zullen ook de mogelijke combinaties van twee Bt-toxines (A en B, A en C, B en C) onderzocht moeten worden.

5.2.3 ALTIJD REKENING HOUDEN MET MOGELIJKE ADDITIEVE EFFECTEN

De COGEM wijst erop dat bij gg-gewassen met meerdere Bt-toxines altijd met mogelijke additieve effecten rekening moet worden gehouden. Een additief effect kan

ervoor zorgen dat een organisme een nadelig effect ondervindt van een combinatie van stoffen terwijl de concentratie van elk van de afzonderlijke stoffen te laag is om voor een effect te zorgen. Hiermee moet in de proefopzet rekening gehouden worden, bijvoorbeeld door voldoende hoge concentraties van de afzonderlijke toxines of de combinatie van de betreffende toxines te testen.

5.3 GENERAL SURVEILLANCE ALS NOODZAKELIJKE COMPLEMENTERENDE MAATREGEL

De COGEM is van mening dat met de hierboven geadviseerde aanpak de risico's voor niet-doelwitorganismen beoordeeld kunnen worden. Het voorkomen van interacties tussen Bt-toxines is echter soortafhankelijk. Doordat het onmogelijk is om alle niet-doelwitorganismen te onderzoeken, blijft er altijd een mogelijkheid bestaan dat bij één van de vele niet onderzochte niet-doelwitorganismen Bt-toxines elkaars werking onverwacht toch blijken te versterken.

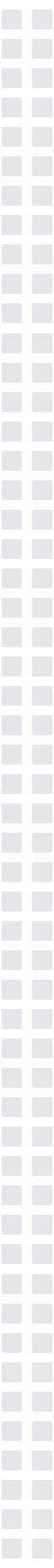
Het monitoren van onverwachte effecten van het gg-gewas (de zogeheten 'general surveillance') is verplicht wanneer een gg-gewas in Europa wordt toegelaten.⁵⁴ Wanneer interacties tussen Bt-toxines onverwacht tot grote nadelige effecten op niet-doelwitorganismen zouden leiden, kan dit door general surveillance opgemerkt worden. General surveillance vervult daarmee ook een belangrijke en noodzakelijke rol voor het opmerken van eventuele effecten als gevolg van onverwachte synergistische interacties.



6

SAMENVATTING VAN DE BELANGRIJKSTE UITGANGSPUNTEN VOOR DE BEOORDELING VAN RISICO'S VOOR NIET-DOELWITORGANISMEN

- Alleen wanneer er op basis van de werking van het ingebrachte gen een reden is om te verwachten dat een gg-gewas een nadelig effect op niet-doelwitorganismen kan hebben, is onderzoek naar het optreden van dergelijke effecten noodzakelijk.
- Laboratoriumexperimenten waarbij een selectie van niet-doelwitorganismen aan het gg-gewas (of gezuiverd eiwit) worden blootgesteld, vormen hierbij de eerste stap.
- Alleen wanneer bij deze laboratoriumexperimenten een effect wordt gedetecteerd, is verder onderzoek noodzakelijk. In een dergelijk geval dient met aanvullende laboratoriumexperimenten te worden bepaald bij welke concentraties een effect optreedt. Daarnaast moet met Europese veldproeven worden onderzocht of het gg-gewas ook in het veld een effect heeft op het betreffende of soortgelijke niet-doelwitorganismen.
- Ongerichte veldproeven, zoals die op dit moment in het kader van vergunningaanvragen voor teelt van gg-gewassen worden uitgevoerd om eventuele onverwachte effecten op niet-doelwitorganismen te detecteren, zijn niet in staat om (kleinere) effecten te detecteren. De COGEM is daarom van mening dat dergelijke veldproeven niet zinvol zijn.
- Bij gg-gewassen met meerdere Bt-toxines is het daarnaast van belang dat bij de risicobeoordeling rekening wordt gehouden met interacties.
- Omdat dergelijke interacties bij mengsels van 3-domein Cry eiwitten tot nu toe alleen zijn waargenomen bij 3-domein Cry eiwitten die tegen dezelfde insectenorde werkzaam zijn, zijn aanvullende studies alleen noodzakelijk wanneer een gg-gewas meerdere 3-domein Cry eiwitten bevat die een effect hebben op dezelfde insectenorde. In dat geval moet worden nagegaan of er niet-doelwitorganismen die tot deze orde behoren in het veld of de naburige omgeving voorkomen. Vervolgens moet worden onderzocht of deze niet-doelwitorganismen een effect ondervinden van een mengsel met alle 3-domein Cry eiwitten die tegen deze orde werkzaam zijn.



Indien dit het geval is, moet onderzocht worden of de gevonden effectgrootte relevant is onder veldomstandigheden.

- Bij mengsels met andere dan 3-domein Cry eiwitten lijkt synergisme vaker voor te komen. Er is echter minder onderzoek gedaan met dergelijke mengsels waardoor er minder goed bepaald kan worden wanneer interacties zouden kunnen optreden.
- Bij gg-gewassen met meerdere Bt-toxines en minimaal één Bt-toxine dat niet tot de 3-domein Cry eiwitten behoort, moet daarom met de gebruikelijke set van 5 niet-doelwitorganismen het effect van het mengsel van Bt-toxines worden onderzocht.
- De COGEM is van mening dat met de leidraad voor de risicobeoordeling die in dit advies is gepresenteerd, de risico's voor niet-doelwitorganismen van gg-gewassen met meerdere Bt toxines met voldoende zekerheid beoordeeld kunnen worden.
- Er kan met laboratoriumonderzoek en veldonderzoek echter nooit volledig uitsluit-
sel gegeven worden of er mogelijke nadelige effecten op niet-doelwitorganismen zullen optreden door onder meer synergisme tussen de in het gg-gewas ingebouwde Bt-toxines. De COGEM wijst daarom op het belang van General Surveillance als 'complementerende' maatregel om de milieuveiligheid te waarborgen.



REFERENTIES

1. COGEM (2009). Standaardisering van laboratoriumtesten met niet-doelwitorganismen. Adviserende brief CGM/090217-02
2. COGEM (2005). Richtlijnen voor het selecteren van niet-doelwitorganismen in het kader van de milieurisicobeoordeling bij de marktintroductie van genetisch gemodificeerde gewassen. COGEM advies CGM/051020-01
3. Charleston DS & Dicke M (2009). Designing experimental protocols to investigate the impact of GM crops on non target arthropods. COGEM onderzoeksrapport CGM 2008-01
4. COGEM (2016). Adviserende brief 'representativiteit van niet-doelwitorganismen'. COGEM advies CGM/161012-02
5. European Food Safety Authority and the Netherlands Commission on Genetic Modification (2013) Event Report, International scientific Workshop "Non-Target Organisms and Genetically Modified Crops: Assessing the effects of Bt proteins" (29-30 November 2012, Amsterdam, the Netherlands) EFSA. Supporting Publications 2013:EN-484
6. EPA (2009). Position paper on scientific issues associated with the data required to register plant-incorporated protectants submitted to the FIFRA scientific advisory panel for review and comment. www.regulations.gov/document?D=EPA-HQ-OPP-2008-0835-0003 (bezoekt op 13 juli 2017)
7. Raybould A *et al.* (2012). Ecological risk assessments for transgenic crops with combined insect-resistance traits: the example of Bt11xMIR604 maize. *J Appl Entomol.* 136: 27-37
8. Graser G *et al.* (2017). A general approach to test for interaction among mixtures of insecticidal proteins which target different orders of insect pests. *J Insect Sci.* 17(2): 39; 1-12
9. De Schrijver A *et al.* (2015). Relevance of Bt toxin interaction studies for environmental risk assessment of genetically modified crops. *Plant Biotechnol J.* doi: 10.1111/pbi.12406
10. Hilbeck A & Otto M (2015). Specificity and combinatorial effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in the context of GMO environmental risk assessment. *Front Environ Sci.* 3:71 doi: 10.3389/fenvs.2015.00071
11. Van der Hoeven N (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: Their mode of action and the potential interaction between them. COGEM research report CGM 2014-02
12. De Schrijver A *et al.* (2014). Can interactions between Bt proteins be predicted and how should effects on non-target organisms of GM crops with multiple Bt proteins be assessed? COGEM research report CGM 2014-05
13. COGEM (2014). Aanbieding onderzoeksrapport '*Bacillus thuringiensis* toxins: their mode of action and the potential for interaction between them'. Signalerende aanbiedingsbrief CGM/141014-01
14. COGEM (2014). Aanbieding onderzoeksrapport 'Can interactions between Bt proteins be predicted?'. Signalerende aanbiedingsbrief CGM/141203-01
15. ACRE, CNB, WIV-ISP & COGEM (2014). Event report International scientific workshop 'Stacked Bt genes: assessment of effects on non-target organisms'. COGEM event report CGM/141217-01
16. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). GM Approval Database. <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/>
17. Van Frankenhuyzen K (2009). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J Invertebr Pathol.* 101: 1-16

18. Van Frankenhuyzen K (2013) Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. *J Invertebr Pathol.* 114: 76-85
19. Tabashnik BE (1992). Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl Environ Microbiol.* 58(10): 3343-3346
20. Cedergreen N (2014). Quantifying synergy: a systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PLoS One* 9(5): e96580
21. Li H & Bouwer G (2014). Evaluation of the synergistic activities of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Invertebr Pathol.* 121: 7-13
22. Monnerat R *et al.* (2014). Synergistic activity of *Bacillus thuringiensis* toxins against *Simulium* spp. larvae. *J Invertebr Pathol.* 121: 70-73
23. Chakrabati SK *et al.* (1998). Synergistic effect of Cry1Ac and Cry1F δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* on cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Curr Sci.* 75(7): 663-664
24. Poncet S *et al.* (1995). Evaluation of synergistic interactions among CryIVA, CryIVB and CryIVD toxic components of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. *J Invertebr Pathol.* 66: 131-135
25. Promdonkoy B *et al.* (2005). Co-expression of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cyt2Aa2 in *Escherichia coli* revealed high synergism against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larvae. *FEMS Microbiol Lett.* 252: 121-126
26. Fernández-Luna MT *et al.* (2010). Single concentration tests show synergism among *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxins against the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus*. *J Invertebr Pathol.* 104: 231-233
27. Khasdan V *et al.* (2001). Toxicity and synergism in transgenic *Escherichia coli* expressing four genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Environ Microbiol.* 3(12): 798-806
28. Nunes Lemes AR *et al.* (2014). Synergism and antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A and Cry1 proteins in *Heliiothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*. *PLoS One* 9(10): e107196
29. Yu X *et al.* (2012). Co-expression and synergism analysis of Vip3Aa29 and Cyt2Aa3 insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Curr Microbiol.* 64(4): 326-331
30. Levine SL *et al.* (2016). Assessing the potential for interaction between the insecticidal activity of two genetically engineered cotton events combined by conventional breeding: an example with COT102 x MON15985. *Regul Toxicol Pharmacol.* 29: 35-41
31. Wirth MC *et al.* (2014). Mtx toxins from *Lysinibacillus sphaericus* enhance mosquitocidal Cry-toxin activity and suppress Cry-resistance in *Culex quinquefasciatus*. *J Invertebr Pathol.* 115: 62-67
32. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (2010). Scientific Opinion on the assessment of potential impacts of genetically modified plants on non-target organisms. *EFSA Journal* 8(11): 1877. doi:10.2903/j.efsa.2010.1877.
33. COGEM (2012). Additional information concerning the application for cultivation of MON89034xNK603 maize. COGEM advice CGM/120327-01
34. COGEM (2008). Cultivation of genetically modified maize line MON88017. COGEM advice CGM/081112-02
35. COGEM (2016). Representativiteit van niet-doelwitorganismen. Adviserende brief CGM/161012-02
36. COGEM (2015). Testing impacts of toxic compounds from transgenic crops on non-target arthropods in tier-1 studies: exposure and response. Aanbiedingsbrief CGM/151217-01
37. COGEM (2013). Additional advisory report on cultivation of maize line 59122. COGEM advice CGM/130507-01

38. COGEM (2011). Additional information concerning the application for cultivation of MON89034xNK603 maize. COGEM advice CGM/110803-01
39. COGEM (2009). Cultivation of maize line MON89034xNK603. COGEM advice CGM/091208-01
40. COGEM (2011). Cultivation of insect resistant maize MIR604. COGEM advice CGM/110404-01
41. De Schrijver A *et al.* (2016). Quality of laboratory studies assessing effects of *Bt*-proteins on non-target organisms: minimal criteria for acceptability. *Transgenic Res.* 25: 395-411
42. COGEM (2008). Cultivation of genetically modified maize line 59122. COGEM advice CGM/080207-02
43. COGEM (2015). Statistiek bij de risicobeoordeling van gg-gewassen. Signalerende brief CGM/151209-01
44. COGEM (2009). Letter of advice on standardising laboratory tests on non-target organisms. CGM/090217-02
45. EFSA (2010). Scientific opinion 'Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants' *EFSA Journal* 2010; 8(11): 1879
46. Booi CJH (2014). Ecological and experimental constraints for field trials to study potential effects of transgenic *Bt*-crops on non-target insects and spiders. COGEM research report CGM 2014-06
47. COGEM (2011). Advies betreffende de Europese bindende richtlijn voor de milieurisicobeoordeling van genetisch gemodificeerde planten. COGEM advies CGM/110307-01
48. COGEM (2007). Cultivation of genetically modified maize line 1507x59122. COGEM advice CGM/071119-02
49. COGEM (2012). Aanbieding onderzoeksrapport 'The use of statistical tools in field testing for effects of GM plants on non-target organisms'. Signalerende aanbiedingsbrief CGM/121127-01
50. Perry JN *et al.* (2010). A mathematical model of exposure of non-target Lepidoptera to *Bt*-maize pollen expressing Cry1Ab within Europe. *Proc Biol Sci.* 277(1686): 1417-1425
51. COGEM (2011). Additional advice on cultivation of maize MON88017. COGEM advice CGM/111209-01
52. Meissle M *et al.* (2012). Establishing a database of bio-ecological information on non-target arthropod species to support the environmental risk assessment of genetically modified crops in the EU. Supporting publications 2012: EN-334 European Food Safety Authority (EFSA)
53. Riedel J *et al.* (2016). Update and expansion of the database of bio-ecological information on non-target arthropod species established to support the environmental risk assessment of genetically modified crops in the EU. EFSA supporting publication 2016: EN-956
54. Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 march 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. *Official Journal of the European Communities* L 106/1-38







POSTBUS 578
3720 AN BILTHOVEN
TEL.: 030 274 2777
FAX: 030 274 4476
INFO@COGEM.NET
WWW.COGEM.NET

