

Multitrofe interacties in genetisch gemodificeerde gewassen

Een enquête ter identificatie van belangrijke aandachtsvelden
voor ecologisch onderzoek

Bart G.J. Knols
Marcel Dicke

Wageningen Universiteit en Research Centrum

Maart 2003, Wageningen

COGEM research 2003-01

Laboratorium voor Entomologie
Wageningen Universiteit en Research centrum
Postbus 8031,
6700 EH Wageningen
e-mail: office.ento@wur.nl

Maart 2003

Dit rapport is in opdracht van de Commissie Genetische Modificatie (COGEM) samengesteld. De meningen die in het rapport worden weergegeven zijn die van de auteurs en weerspiegelen niet noodzakelijkerwijs de mening van de COGEM.

Inhoud

1. Samenvatting	5
2. Introductie	7
3. Achtergrond – deskstudie bevindingen	11
4. Doelstellingen en Aanpak	13
5. Bevindingen	17
5.1. Algemene en specifieke leemtes in kennis	17
5.1.1. <i>Toepassing van de Bt-eigenschap en expressie van Cry-proteïnen</i>	17
5.1.2. <i>Effecten van de Bt-eigenschap op de plant (1^e trofisch niveau)</i>	18
5.1.3. <i>Bodemaspecten</i>	19
5.1.4. <i>Bt-toxinen in het voedselweb</i>	19
5.1.5. <i>Procesdynamiek en lange termijn effecten</i>	20
5.1.6. <i>Interactie met (half) natuurlijke ecosystemen</i>	21
5.1.7. <i>Horizontale genoverdracht</i>	22
5.2. Belangrijke ecologische vragen	23
5.3. Modelsysteem en referentiekader	24
5.4. Aandachtsvelden voor onderzoek	26
6. Bijdrage aan risicobeoordeling	29
7. Conclusies	33
8. Aanbevelingen voor een onderzoeksprogramma	35
9. Dankwoord	37
10. Literatuur	38
Annex 1	41
Annex 2	44

1. Samenvatting

De ecologie van multitrofe interacties, en de invloed daarop van toevoeging van *Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenen aan het genoom van land- en tuinbouwgewassen, staat centraal in dit rapport. In navolging op een deskstudie die een synopsis vormt van het reeds gedane onderzoek op dit gebied, levert de huidige enquête 1 inzicht in de visie van negen prominente Nederlandse wetenschappers omtrent de algemene en specifieke leemtes in ecologische kennis t.a.v. multitrofe interacties in Bt-gewassen. De keuze voor een modelgewas dat geschikt is voor het aanvullen van deze kennis – aan de hand van een aantal basiscriteria – werd besproken, alsmede de keuze van een referentiekader. Tevens werd geïnventariseerd welke ecologische expertise aanwezig is om zulk onderzoek uit te voeren.

Naast directe dan wel indirecte blootstelling van herbivoren en hogere trofische niveaus aan Bt-endotoxinen werden accumulatie, persistentie en verspreiding van toxinen in het voedselweb, zowel onder- als bovengronds, en zowel in het agro-ecosysteem als in het aangrenzend (half)natuurlijk systeem als belangrijkste aspecten aangeduid. Vergelijkend multitroof onderzoek aan transgeen koolzaad (*Brassica napus*) en/of koolraap (*B. n. napobrassica*) in relatie tot isogene lijnen met (conventioneel) ingekruiste resistentie dan wel gevoelige lijnen waarin gangbare plaagbestrijding plaatsvindt werd als model systeem aangewezen. De toevoeging van wilde cruciferen (*B. nigra*, *B. oleraceae*, *Arabidopsis thaliana*) aan dit modelsysteem is gewenst. Vier hoofdthema's voor onderzoek kwamen naar voren n.l. 1) effecten op individuele interacties, 2) relatie tussen ondergrondse en bovengrondse effecten, 3) 'community' ecologie en 4) ontwikkelen van (simulatie) modellen en studies op populatieniveau.

Het is essentieel dat de resultaten van studies binnen deze hoofdthema's direct kunnen bijdragen aan het in kwantitatieve zin weergeven van grenzen waarbinnen mogelijke ecologische effecten acceptabel zijn en zodoende bijdragen aan het opstellen van criteria voor risicobeoordeling. Binnen de Nederlandse institutionele en academische wereld is een ruime expertise en animo aanwezig om aan bovenstaande ecologische aspecten onderzoek te verrichten. Aanbevelingen voor het opzetten van een onderzoeksprogramma dat zich richt op de ecologie van multitrofe interacties in Bt gewassen worden gepresenteerd.

¹ Eindverantwoordelijkheid voor de inhoud van dit rapport rust uitsluitend bij de auteurs.

2. Introductie

“LUSAKA (Zambia) - The United States, while condemning Zambia's rejection of genetically-modified food to save its people from starvation, was reported last week to have promised the country 30,000 tonnes of unmodified grain. – Reuters (9 December 2002)”

Met 28,000 hits op de woorden ‘GM food Zambia’ in de Google zoekmachine moge het duidelijk zijn dat de toepassing van voedselbiotechnologie een actueel, controversieel en veelbesproken onderwerp is (Aldhous, 2002). Ook Nederland en andere lidstaten van de Europese Unie worden in toenemende mate geconfronteerd met de toepassingen van de biotechnologie in de landbouw, hetgeen zowel op wetenschappelijk als op maatschappelijk vlak tot discussie leidt.

Feit is dat de toepassing van genetisch gemodificeerde (ofwel transgene) gewassen in snel tempo toeneemt, zowel in de Westerse wereld als in ontwikkelingslanden. Als voorbeelden dienen hier de recent gepubliceerde artikelen over de toename in gebruik van Bt-maïs in the Verenigde Staten (Pilcher et al., 2002) en Bt-katoen in China (Pray et al., 2002; doch zie ook Yimin & Mervis, 2002), waar nu op een derde van het totaal areaal voor katoenproductie transgene variëteiten worden verbouwd (ca. 1.5 miljoen ha). Wereldwijd bestrijkt het areaal waarop transgene gewassen worden geteeld nu >45 miljoen hectaren, waarvan bijna een kwart met gewassen die resistent zijn tegen plaaginsecten (James et al., 2000; Shelton et al., 2002).

Transgene gewassen (die gewassen waar middels biotechnologische technieken een overerfbare eigenschap aan is toegevoegd) kennen verscheidene voordelen zoals bijvoorbeeld verhoogde opbrengsten en vermindering in het gebruik van pesticiden. Daarnaast kunnen rassen worden gecreëerd die verbouwing onder extreme omstandigheden mogelijk maakt (droogte- en kouderesistentie) waardoor het potentieel aan landbouwareaal drastisch kan toenemen.

Er worden echter zowel maatschappelijke, sociaal-economische als technische redenen aangevoerd die vooralsnog een verdere uitbreiding, met name in West Europa, in de weg staan. Zo wordt de monopolie van zaadleveranciers van Bt-gewassen als een struikelblok gezien voor kleinschalige boeren in ontwikkelingslanden, staat de ethiek van genetische modificatie nog steeds ter discussie, en kan resistentie van plaaginsecten tegen Bt-gewassen optreden. Daarnaast wordt een afname aan biodiversiteit die het gevolg kan zijn van de introductie van transgene gewassen bekritiseerd en is er nog onvoldoende kennis omtrent de potentiële milieueffecten bij het gebruik van transgene gewassen.

In de Nederlandse en Europese landbouw wordt verduurzaming sterk gestimuleerd, waarbij hoge productie en milieuvriendelijkheid moeten samengaan en lange termijnoplossingen belangrijker zijn dan korte termijnoplossingen. Dit betekent dat de voorkeur gegeven wordt aan systeemoplossingen boven symptoombestrijding. Onder

symptoombestrijding valt bijvoorbeeld chemische bestrijding van insectenplagen, waarbij een probleem geïsoleerd aangepakt wordt zonder de consequenties voor het systeem als geheel in ogenschouw te nemen. De verduurzaming van de landbouw zal ook beïnvloed kunnen worden door de toekomstige rol van transgene gewassen daarbinnen (Lotz et al., 2002). Om een maximaal voordeel uit de toepassing van deze gewassen te behalen met een minimum aan eventueel nadelige of zelfs schadelijke neveneffecten dient de toelating van transgene gewassen voor zowel experimenteel als grootschalig gebruik goed te worden gecontroleerd. Daarbij zullen ecologische aspecten van groot belang zijn om te voorkomen dat we in dezelfde situatie komen als met chemische bestrijding van plagen het geval was.

De COGEM (Commissie genetische modificatie; voor uitgebreide beschrijving van taken en doelstellingen zie www.cogem.net/overcogem/index.htm), in haar functie als adviserend orgaan voor het Ministerie van VROM, is o.a. belast met de beoordeling van aanvragen voor vergunningen om transgene gewassen op experimentele basis toe te passen in de Nederlandse land- en tuinbouw. Het vergaren van informatie over de mogelijke ecologische gevolgen van toelating is hierbij van belang.

In opdracht van het ministerie van VROM en onder begeleiding van de COGEM zijn in 2000-2002 een aantal deskstudies uitgevoerd die tot doel hadden een overzicht te verwerven in het gedane onderzoek aan transgene gewassen (op mondiaal niveau) met als hoofdthema's: multitrofe interacties, bodemecosystemen, en uitkruising. De eerste van deze studies werd uitbesteed aan Wageningen Universiteit en Research centrum (Groot & Dicke, 2001; 2002). De studie naar bodemecosystemen werd uitgevoerd door het Centrum voor Terrestrische Ecologie (NIOO-KNAW) (Bruinsma et al., 2002) in Heteren, en de studie naar uitkruising vindt momenteel plaats aan de Vrije Universiteit van Amsterdam. Een overzicht van de belangrijkste bevindingen van de deskstudie naar multitrofe interacties, die de basis vormen voor de huidige enquête, wordt gegeven in hoofdstuk 3.

Het brede karakter van deze deskstudies leverde een gedetailleerd overzicht op over het wetenschappelijk onderzoek aan multitrofe interacties en ecologische aspecten van Bt-gemodificeerde gewassen. Er is daarnaast behoefte aan gerichte studies die relevant zijn voor de Nederlandse situatie. Zulke studies zijn essentieel om vergunningaanvragen te kunnen toetsen binnen de Nederlandse wet- en regelgeving. De volgende aspecten dienen te worden beschouwd:

- In hoeverre zijn de resultaten van reeds uitgevoerde studies (veelal buiten Nederland) van belang voor en vergelijkbaar met de situatie in de Nederlandse land- en tuinbouw;
- In hoeverre kan de uitgevoerde literatuurstudie direct bijdragen aan de beoordeling van vergunningaanvragen door de COGEM m.b.t. toepassing van transgene gewassen in Nederland;
- Zijn er specifieke situaties binnen de Nederlandse land- en tuinbouw in relatie tot de toepassing van transgene gewassen die internationaal minder van belang of nog niet onderzocht zijn;
- De uitgevoerde literatuurstudie geeft geen inzicht in de bestaande Nederlandse capaciteit voor ecologisch onderzoek aan transgene gewassen, hetgeen uiteraard van

groot belang is indien onderzoek de leemtes in kennis voor goede beoordeling van aanvragen moet opvullen.

In vervolg op de eerdere studies, en het door de COGEM georganiseerde ecologenberaad van Januari 2002 is daarom besloten om, in opdracht van de COGEM, binnen Nederland een enquête te organiseren waarin vooraanstaande ecologen werden geïnterviewd om hun specifieke visies en ideeën omtrent ecologisch onderzoek aan transgene gewassen te documenteren.

Dit rapport is de verslaglegging van deze vervolgstudie die werd uitgevoerd in oktober / november 2002. De doelstellingen en de gevolgde aanpak worden beschreven in hoofdstuk 4. Vervolgens worden de bevindingen van de enquête weergegeven in hoofdstuk 5, eerst in algemene zin, daarna toegespitst op de belangrijkste ecologische vraagstukken en aandachtsvelden voor onderzoek. Hoe toekomstig onderzoek uiteindelijk kan bijdragen aan de beoordeling van vergunningaanvragen is beschreven in hoofdstuk 6. De belangrijkste bevindingen, conclusies en aanbevelingen voor het opzetten van een onderzoeksprogramma worden tenslotte beschreven in hoofdstuk 7 en 8.

3. Achtergrond – deskstudie bevindingen

Het inbouwen van resistentie tegen plaaginsecten in gewassen middels het toevoegen van een genetische eigenschap aan het plantengenoom wordt in toenemende mate toegepast als vervanging voor conventionele methoden van plaagbestrijding. Er zijn verscheidene basale overeenkomsten met traditionele methoden zoals chemische plaagbestrijding, al zijn er ook duidelijke verschillen. Zo produceert de transgene plant zelf gedurende haar levensduur systemisch het insecticide (endotoxine) i.p.v. periodieke bespuiting van het gewas door de boer. De aanwezigheid van door de plant geproduceerde toxinen in het voedselweb is zowel in tijd als in ruimte vele malen groter dan bij chemische bespuiting. Bovendien kunnen de gebruikte doses veel hoger zijn bij gebruik van transgene gewassen dan bij bespuiting. Dit kan grote effecten hebben op de verschillende actoren in het voedselweb en daarmee tot ongewenste neveneffecten leiden.

De deskstudie uitgevoerd door Groot & Dicke (2001, 2002) geeft een samenvatting van de huidige kennis over de invloed van (Bt) genetisch gemodificeerde gewassen en conventioneel veredelde gewassen op multitrofe interacties, vanuit een ecologisch perspectief. Aandacht werd specifiek besteed aan de invloed van Bt-endotoxinen op niet-doel insecten, parasitoïden en predatoren van plaaginsecten. Het rapport bevat 22 conclusies en aanbevelingen voor verder onderzoek die zijn samen te vatten in drie hoofdonderwerpen:

- Hoe verhoudt de toepassing van Bt-gewassen zich tot conventionele bestrijdingsmethoden (chemisch zowel als biologische bestrijding, en resistentieveredeling);
- Wat zijn de effecten van accumulatie en blootstelling aan toxinen op de verschillende trofische niveaus, zowel onder- als bovengronds;
- Wat zijn de effecten en gevolgen van Bt-resistentie en hoe kan deze voorkómen worden.

Het is, gezien de enorme schaal waarop Bt-gewassen reeds worden toegepast, verbazingwekkend hoe weinig informatie beschikbaar is ter inschatting van de ecologische gevolgen daarvan. Zo zijn de effecten van waardplantresistentie op niet-doel insecten slechts summier bekend, en zijn de interacties veelal niet in bredere zin (d.w.z. in voedselweb context) bestudeerd. Bovendien zijn er zowel negatieve, neutrale, als positieve effecten gedocumenteerd, afhankelijk van welke soort of welk trofisch niveau bestudeerd werden. Er is nauwelijks aandacht besteed aan populatiedynamische en populatiegenetische aspecten, en inzicht in lange termijn effecten is tot op heden afwezig. Het inschatten van ecologische risico's van genetisch gemodificeerde gewassen is daardoor op dit moment niet goed mogelijk. Groot & Dicke (2001) hebben een aanzet gegeven hoe de effecten van toepassing van een transgeen gewas op multitrofe interacties kunnen worden ingeschat en geëvalueerd. Vier aspecten zijn daarbij naar voren gekomen:

1. **Wat zijn de belangrijkste herbivoren in het agro-ecosysteem?** Naast plaaginsecten waartegen het gewas resistent is kunnen ook andere herbivoren voorkomen die

economische schade teweeg kunnen brengen danwel herbivoren die normaliter geen schade veroorzaken. De mate waarin endotoxinen deze drie groepen van herbivoren beïnvloeden is van belang, zeker wanneer de herbivore zelf geen nadelige effecten ondervindt, en daarmee blootstelling van hogere trofische niveaus verwezenlijkt.

2. **Wat zijn de natuurlijke vijanden (parasitoïden, predatoren) van deze herbivoren?** Leden van het 3^e trofisch niveau hebben zelf vaak een interactie met de plant gedurende een bepaald pre-imaginaal levensstadium danwel als volwassen insect. De directe blootstelling aan Bt-toxinen is daarbij van belang en kan de overleving en bijdrage aan plaagbestrijding negatief beïnvloeden.
3. **Welke bestuivende insecten komen voor in het gewas?** Wanneer de Bt-eigenschap ook tot expressie komt in het stuifmeel van de plant kan dit een invloed hebben op bestuivende insecten waarvoor stuifmeel als larvaal voedsel dient.
4. **Wat zijn de belangrijkste bodemorganismen?** Consumptie van toxinen die in gebonden vorm in de bodem aanwezig zijn kan bodemorganismen direct nadelig beïnvloeden. Ook kunnen de toxinen indirect (middels accumulatie) in hogere trofische niveaus terecht komen en daar een nadelig effect teweeg brengen.

Voor verdere details wordt verwezen naar de rapportage van deze deskstudie (Groot & Dicke 2001).

4. Doelstellingen en Aanpak

Bij de evaluatie van aanvragen voor een vergunning om met transgene gewassen veldproeven te mogen doen is het van belang dat ecologische aspecten (in dit geval multitrofe interacties m.b.t. transgene gewassen) worden meegewogen. Tot op heden hebben deskstudies in opdracht van het ministerie van VROM inzicht verschaft in de factoren die mogelijk van belang zijn wanneer Bt-gewassen worden toegepast in tegenstelling tot isogene variëteiten en conventionele plaagbestrijding. Ook hebben deze studies geleid tot het definiëren van belangrijke aandachtsvelden voor ecologisch onderzoek en de leemtes in kennis weergegeven.

Zoals vermeld in de introductie leveren deze deskstudies geen specifiek inzicht in de relevantie van het gedane onderzoek voor de Nederlandse situatie, kunnen deze geen directe bijdrage leveren aan de evaluatie van vergunningaanvragen door de COGEM, en geven ze geen inzicht in de onderzoekscapaciteit in Nederland voor wat betreft studies aan transgene gewassen.

De huidige enquête onder vooraanstaande Nederlandse ecologen had een tweeledig doel:

- Het verschaffen van inzicht in de belangrijkste ecologische onderzoeksvragen m.b.t. multitrofe interacties in transgene (Bt) gewassen. Van speciaal belang is dat de onderzoeksvragen relevant zijn voor de beoordeling van aanvragen voor toepassing van genoemde gewassen door de COGEM.
- Het definiëren van belangrijke aandachtsvelden voor onderzoek dat als basis kan dienen voor het initiëren van een nieuw onderzoeksprogramma binnen Nederlands Wetenschappelijk Onderzoek (NWO).

De ontwikkeling van transgene gewassen betreft een grote verscheidenheid aan eigenschappen (verandering van voedingswaarde, herbicideresistentie etc.) die worden toegevoegd aan commercieel geteelde planten. De eigenschappen die commercieel worden toegevoegd ter bestrijding van plaaginsecten zijn vooralsnog beperkt tot inclusie van *Bacillus thuringiensis* (Bt) constructen, coderend voor δ -endotoxinen, doch andere toepassingen voor plaagbestrijding zijn in ontwikkeling. In alle gevallen die nog in de ontwikkelingsfase zijn en die resistentie tegen insecten betreffen, gaat het om het toevoegen van toxinen aan planten. De verscheidenheid aan eigenschappen maakt een toespitsing van de aanpak voor de huidige studie / enquête noodzakelijk:

- In de enquête is alleen aandacht besteed aan Bt-gewassen daar andere transgene gewassen met eigenschappen voor plaagbestrijding nog niet worden toegepast. Het ligt echter in de verwachting dat de toevoeging van andere toxinen onderhevig zal zijn aan dezelfde ecologische vraagstukken;
- Er is uitsluitend aandacht besteed aan de rol van transgene gewassen binnen het kader van de verduurzaming van de Nederlandse land- en tuinbouw. Sociaal-economische, bedrijfstechnische, maatschappelijke en ethische aspecten werden niet behandeld;
- De potentiële milieueffecten stonden centraal binnen het huidige onderzoek en richtten zich op drie aspecten: 1. gevolgen van en potentieel voor uitkruising, 2. effecten op

bodem ecosystemen, m.n. bodem micro-organismen, en 3. multitrofe interacties. Dit laatste onderwerp werd specifiek behandeld in de huidige enquête.

- Het gebruik van Bt-toxinen kent twee toepassingen, namelijk inclusie van een transgen construct in het plantengenoom, danwel het direct gebruik van toxinen als extern insecticide. Deze laatste toepassing werd niet meegenomen in de huidige studie.

Bovenstaande beperkingen waren echter niet bindend, en er werden mogelijkheden gecreëerd om tijdens de interviews, waar van belang, ook op deze zaken in te gaan.

De interviews (zie Annex 1 voor de lijst van geënquêteerden) werden middels bezoek aan de werklocaties van de geënquêteerden voltooid. Ter voorbereiding op het gesprek werd het rapport van de deskstudie van Groot & Dicke naar de geënquêteerden verzonden. Voorafgaand aan de bespreking van de vragenlijst werd een korte powerpoint presentatie gegeven (Annex 2), waarin de belangrijkste bevindingen van de voorafgaande literatuurstudie werden gepresenteerd, alsmede de doelstellingen en afbakening van het interview. Vervolgens werd een serie vragen voorgelegd (zie hieronder), waarbij opnieuw de deskstudie van Groot & Dicke (2001) als basis fungeerde. Deze vragen werden aanvankelijk door ons opgesteld en zijn op 28 oktober 2002 voorgelegd ter goedkeuring aan de begeleidingscommissie (Annex 1).

De gesprekken duurden gemiddeld 1.5-2 uur. Nadien werd het interview uitgewerkt en dienden de samenvattingen daarvan als basis voor het huidig document. Een eerste versie hiervan werd voorgelegd aan de geënquêteerden en hun opmerkingen en suggesties zijn verwerkt in dit eindrapport. Een eerste presentatie van de bevindingen voor de begeleidingscommissie vond plaats op 6 december, gevolgd door een presentatie voor de sub-commissie Landbouw van de COGEM op 17 december 2002.

De volgende vragen werden voorgelegd tijdens de interviews:

Deel 1:

- a) Gezien de gedane studies naar de effecten van Bt-gewassen op de ecologie van zowel plaaginsecten als niet-doel insecten en hun predatoren / parasieten, waar zitten de belangrijkste leemtes in onze kennis?

Doel: Om de geïnterviewde vanuit zijn/haar achtergrond en expertise de mogelijkheid te bieden om in een breed kader aan te geven welke informatie gewenst danwel cruciaal is om de effecten van Bt-gewassen voor wat betreft multitrofe interacties, te kunnen beoordelen.

- b) Welke van deze leemtes zijn het belangrijkste als het gaat om het inschatten van de risico's van transgene gewassen m.b.t. multitrofe interacties?

Doel: Het aanbrengen van een rangorde in mate van belangrijkheid in de onder vraag 1a besproken onderwerpen. Bij vraag 1a/b was het mogelijk om middels 'links' naar achtergrond informatie te verwijzen, informatie over gedane studies, en referenties.

Deel 2:

a) Welk multitroof systeem zou gekozen moeten worden om een zo duidelijk mogelijk inzicht te verwerven in de ecologische effecten van Bt-gewassen?

Doel: Inzicht verwerven in een mogelijk systeem (1e trofisch niveau) dat gebruikt kan worden om de leemtes in kennis die in vraag 1a/b besproken zijn op te vullen. Door onszelf waren de 'ideale' eigenschappen waaraan zo'n systeem zou moeten voldoen opgesteld en deze werden bij het presenteren van de vraag getoond:

- a) Het gewas is van belang in de Nederlandse landbouw*
- b) Het gewas is reeds genetisch gemodificeerd (Bt) en zal, in navolging op toelating, naar verwachting op grote schaal gebruikt gaan worden*
- c) Het gewas functioneert als eerste trofisch niveau van een multitroof systeem waarvan de complexiteit redelijk bekend is, en de ecologie en life-history van de belangrijkste soorten beschreven is en toepasbaar voor experimenteel onderzoek*
- d) Er is zowel een tweede als derde trofisch niveau, en bij voorkeur een vierde niveau dat doel herbivoren, niet-doel herbivoren, bestuivende insecten, 1e en 2e orde parasieten en predatoren (bij voorkeur meer dan 1 soort per groep) bevat*
- e) Het gewas kan als standaardmodel dienen voor studies naar microbiologische effecten, uitkruising, en multitrofe interacties*
- f) Het model leent zich voor studies onder zowel laboratorium, semi-veld (kassen) als open veld situaties*
- g) Het modelsysteem kan gebruikt worden voor studies op zowel organismaal als populatieniveau*
- h) Er bestaan meerdere Bt-cultivars van het gewas (met verschil in expressie van endotoxinen (concentraties)) waardoor studies naar blootstelling, accumulatie, persistentie, verspreiding en eventuele resistentieontwikkeling kan worden bestudeerd t.a.v. verschillende concentraties van endotoxinen die beschikbaar komen in het eerste trofisch niveau*
- i) Het gewas leent zich voor studies naar bovengrondse en ondergrondse effecten*

b) Voldoet dit model aan multitrofie, d.w.z. zijn er interacties tussen zowel doel- als niet-doel herbivoren en parasieten / predatoren, zijn bestuivende insecten van belang, en kunnen effecten op bodem arthropoden worden bestudeerd?

c) Welke interacties tussen trofische niveaus verdienen speciale aandacht, en welke kunnen het beste bijdragen aan het inschatten van de ecologische effecten van Bt-gewassen?

d) Hoe reductionistisch van aard mag het model zijn om inzicht in de volledige complexiteit van het multitrofisch systeem niet te verwaarlozen?

Doel (vraag 2b-d): Toetsen van de keuze voor een bepaald model voor wat betreft de aanwezigheid van soorten van de verschillende trofische niveaus, en het aangeven van de belangrijkste interacties die bestudering van ecologische effecten mogelijk maken.

Deel 3:

- a) Hoe kenmerkend zijn de reeds uitgevoerde studies voor de Nederlandse landbouw? Zijn er onderzoeksaspecten specifiek van belang voor Bt-gewassen en hun toelating in Nederland?
- b) Wat is het referentiekader? M.a.w. waarmee vergelijk je het modelsysteem? Met gangbare landbouwtechnieken, met geïntegreerde bestrijding of met biologische landbouw?
- c) Hoe evalueer je het belang van het gemeten effect?
- d) Welke algemene dan wel specifieke onderzoekstechnieken zijn nodig om deze leemtes op te vullen?

Doel (vraag 3a-d): Het aangeven welke situaties uniek zijn in Nederland waar rekening mee dient te worden gehouden in onderzoek; het bespreken van 'de controle', ofwel het systeem waarmee de ecologische effecten van Bt-gewassen dienen te worden vergeleken. Tot slot het aanduiden van methoden en technieken die hierbij een rol spelen.

Deel 4:

- a) Welk systeem wordt nu bestudeerd in uw onderzoeksgroep? Kan dit systeem bijdragen aan de opheldering van ecologische vraagstukken m.b.t. Bt-gewassen? Zo ja, op wat voor manier?
- b) Is de groep bereid om specifiek onderzoek te verrichten aan multitrofe interacties t.a.v. Bt-gewassen (onder voorwaarde dat financieringsmogelijkheden beschikbaar komen via een NWO programma)? Zo ja, waar zou de groep specifiek aandacht aan willen besteden (en waarom is dat belangrijk)?
- c) Zijn er nog andere aspecten die U van belang acht die hier niet zijn besproken?

Doel (vraag 4a-c): Afbakening van huidige onderzoeksinteresse van geënquêteerden en hoe hun onderzoek kan bijdragen aan het inschatten van ecologische effecten van Bt-gewassen. Polsen van bereidheid tot deelname aan een nationaal onderzoeksprogramma aan Bt-gewassen.

5. Bevindingen

5.1. Algemene en specifieke leemtes in kennis

Beperking van (economische) schade aan gewassen die belaagd worden door herbivore arthropoden en pathogenen kan op verscheidene manieren plaatsvinden. De plant zelf kan door middel van directe en / of indirecte afweermechanismen herbivorie reduceren (Dicke, 1999), middels bijvoorbeeld de productie van stoffen die toxisch zijn voor de herbivoor of door productie van secundaire afweerstoffen die als signaalstoffen fungeren voor belagers van de herbivoor (Dicke & Van Loon, 2000). Het natuurlijk vermogen van de plant om herbivorie tegen te gaan kan door klassieke resistentieveredeling dan wel biotechnologische veranderingen (zoals het toevoegen van de Bt-eigenschap (Baum et al., 1999)) worden verhoogd.

Voor duurzame methoden van gewasbescherming is het van belang dat de oplossingen voor problemen geen korte termijn symptoombestrijding zijn maar langdurige systeemoplossingen. In het verleden werden insectenproblemen veelal opgelost m.b.v. pesticiden. Dit leidde tot een tredmolen waarin telkens nieuwe pesticiden gevonden moesten worden omdat de plaaginsecten resistentie ontwikkeld hadden tegen de pesticiden en omdat pesticiden ongewenste neveneffecten hadden waardoor secundaire plagen uitgroeiden tot de belangrijkste plagen in een gewas (De Bach, 1974). Uiteindelijk werd het steeds moeilijker om nog effectieve pesticiden te vinden. Lange termijn systeemoplossingen worden gekenmerkt door hun vermogen om insectenplagen te voorkomen zonder dat er te pas en te onpas hoeft te worden ingegrepen om plaagontwikkeling te onderdrukken.

De natuurlijke afweer en kunstmatige (conventionele) bestrijding van herbivoren op gewassen vormden de basis voor de discussie over de afwezigheid van kennis in algemeen dan wel specifiek opzicht waar rekening mee moet worden gehouden bij de toepassing van transgene (Bt) gewassen. De volgende aspecten zijn tijdens de gesprekken naar voren gekomen:

5.1.1. Toepassing van de Bt-eigenschap en expressie van Cry-proteïnen

De vijf groepen van Bt-proteïnen die tot expressie kunnen worden gebracht in gewassen (Cry1-Cry9; Höfte & Whitely, 1989; Crickmore, 2001) zijn specifiek toxisch voor bepaalde groepen insecten (lepidopteren, dipteren en coleopteren), en tot voor kort zijn planten zodanig gemodificeerd dat slechts één enkel (Cry)eiwit tot expressie komt (verticale waardplantresistentie), en wel systemisch in alle delen van de plant (met uitzondering van de (extra)florale nectariën en floeem sappen (Raps et al., 2001)). Juist deze systemische expressie verhoogt de blootstelling van zowel doel- als niet-doel herbivoren en daarmee het risico op resistentie-ontwikkeling (Tabashnik, 1994). Dit in tegenstelling tot het gebruik van Bt als gespoten insecticide, waarbij slechts periodieke blootstelling plaatsvindt en daarmee het risico op resistentie-ontwikkeling veel lager ligt

(Gould, 1998). De noodzaak van systemische expressie is echter niet altijd aanwezig daar de interactie van plantbelagers (het 2e trofisch niveau), zowel onder- als bovengronds, vaak beperkt is tot specifieke plant onderdelen of zelfs celgroepen.

De productie van meerdere Cry-proteïnen in de plant ('gene-stacking'), gekoppeld aan selectieve expressie in die onderdelen van de plant die belaagd worden door de herbivoor, kent verscheidene voordelen:

- a) De kans dat resistentie optreedt tegen meerdere Cry-proteïnen waarbij simultaan genetische veranderingen moeten optreden die binding door meerdere receptoren in de middendarm van de herbivoor vermindert, wordt sterk verlaagd, zeker wanneer deze methode wordt toegevoegd aan bestaande praktijken om resistentie-ontwikkeling tegen te gaan (zoals gen-rotatie, expressie van hoge doses van toxinen, of het toepassen van het 'refuge' concept (Tabashnik, 1994; Whalon & Norris, 1996; Roush, 1997; 1998; Fitt & Wilson, 2000)). De toepassing van hoge doses heeft echter grote kansen op neveneffecten op niet-doel organismen (Groot & Dicke 2001).
- b) Wanneer selectieve expressie van Cry-proteïnen plaatsvindt in die onderdelen van de plant waarmee de (schadelijke) herbivoor in aanraking komt, levert dit een sterke reductie in blootstelling van niet-doel herbivoren en hun predatoren op, met als gevolg een verlaging van opname van toxinen in het voedselweb. Indien bijvoorbeeld expressie van Bt-endotoxinen niet in pollen plaatsvindt, zal dit zowel het directe effect op bestuivende insecten verminderen als de kans op uitkruising naar wilde varianten verminderen.
- c) In tegenstelling tot systemische productie van toxinen, zal selectieve expressie van de eigenschap de nutriëntenhuishouding van de plant minder beïnvloeden, waardoor de invloed van de Bt-eigenschap op de fysiologie en fitness van de plant (en de daarmee gepaard gaande natuurlijke afweer) wellicht lager zal zijn.

Leemtes in kennis: a) beperkte kennis omtrent de effecten die expressie van meerdere toxinen zou kunnen hebben op resistentie-ontwikkeling; b) de invloed van selectieve expressie van Bt-toxinen in bepaalde onderdelen van de plant op de ecologie van multitrofe interacties, i.t.t. systemische expressie, is vooralsnog onbekend.

5.1.2. Effecten van de Bt-eigenschap op de plant (1^e trofisch niveau)

Het aanbrengen van de Bt-eigenschap in het plantengenoom, en expressie middels de productie van endotoxinen is niet een op zich zelf staande toevoeging zonder verdere consequenties voor de plant en haar functioneren binnen het ecosysteem. De plant moet hulpbronnen aanwenden om productie van endotoxinen te verwezenlijken, en afhankelijk van de beschikbaarheid van die hulpbronnen zullen andere processen in de plant beïnvloed worden. Bt-endotoxinen kunnen tot 5% van het totale eiwit in de plant innemen (Kota *et al.*, 1999). Het is vooralsnog onbekend of en hoe de productie van endotoxinen andere basisprocessen in de plant beïnvloedt, en daarnaast in welke mate de directe (toxische verbindingen in groene plantendelen of wortel exudaten) en/of indirecte afweer (via

natuurlijke vijanden van plaaginsecten) verandert en de fitness van de plant beïnvloed wordt (Strauss *et al.*, 2002).

Leemtes in kennis: a) de invloed van de Bt-eigenschap op de kringloop van nutriënten en basale fysiologische processen in de plant; b) invloed van Bt-endotoxinenproductie op het natuurlijk vermogen van de plant om afweer tegen herbivorie te bewerkstelligen.

5.1.3. Bodemaspecten

Bt-endotoxinen, geproduceerd door de plant, komen terecht in de bodem middels ondergrondse herbivorie, via het afsterven van ondergrondse dan wel bovengrondse plantendelen, of van insecten die toxinen geconsumeerd hebben. Ook is aangetoond dat wortellexudaten Bt-endotoxinen kunnen bevatten (Saxena *et al.*, 1999). Afhankelijk van het type bodem, zuurgraad en klimaatomstandigheden kunnen de proteïnen binden aan bodemdeeltjes en als toxine beschikbaar blijven voor bodemorganismen over langere perioden (Tapp & Stotzky, 1998). Cry1A(c) proteïnen, bijvoorbeeld, die vrijkwamen uit bladeren van katoenplanten bleven in gebonden vorm aanwezig in de bodem over een periode van vijf maanden (Palm *et al.*, 1996). Afhankelijk van de teeltfrequentie kan daardoor accumulatie van toxinen in de bodem plaatsvinden. Er is slechts zeer beperkte informatie beschikbaar over de effecten hiervan op bodemorganismen. Saxena & Stotzky (2001) maten geen effect op verschillende bodem-protoczoa, bacteriën, schimmels en nematoden maar stelden wel ophoping van toxinen in regenwormen vast. Recent onderzoek aan nematode resistente transgene aardappellijnen (middels productie van cystatinen) heeft, afhankelijk van het type transgene lijn, laten zien dat veranderingen in de microbiële- en schimmelsamenstelling kunnen optreden, al weken deze veranderingen niet af van de effecten die een nematocide behandeling veroorzaakte (Cowgill *et al.*, 2002).

In tegenstelling tot de bovengrondse ecologie van multitrofe interacties, spelen de effecten in de bodem slechts een rol op kleinere schaal. Accumulatie en persistentie van Bt-toxinen in de rhizosfeer van de plant kunnen echter indirecte gevolgen hebben voor bodemorganismen waardoor de geschiktheid van de bodem voor opvolgende gewassen (of wilde planten) kan veranderen. In aangrenzende (halfnatuurlijke) ecosystemen (randen van akkers bijvoorbeeld) is het voornamelijk onbekend hoe de aanwezigheid van (gebonden) toxinen de ecologie (en successie van) wilde planten beïnvloedt.

Leemtes in kennis: a) Er is slechts weinig informatie beschikbaar over de invloed van Bt-toxinen op de microbiële-, schimmel- en arthropodenfauna in de bodem; b) Er is geen informatie over de invloed van (accumulatie en persistentie van) Bt-toxinen in de bodem op de successie van (natuurlijke) plantensoorten.

5.1.4. Bt-toxinen in het voedselweb

Het vrijkomen en doorgeven van Bt-toxinen in de verschillende trofische niveaus en delen van het voedselweb, zowel onder- als bovengronds, werd gezien als belangrijkste aandachtsveld om risicobeoordeling te verbeteren. Hierbij kwamen een aantal belangrijke punten naar voren:

- *Specificiteit van Bt-toxinen.* Het binden van toxinen aan receptoren in de middendarm van insecten, gevolgd door perforatie van de darm, is essentieel voor de bestrijding van doel herbivoren. Er is echter nog onvoldoende kennis omtrent de specificiteit van toxinen. Beter inzicht in het mechanisme van binding kan een belangrijke bijdrage leveren aan het inschatten welke soorten insecten gevoelig zullen zijn voor toxinen.
- *Invloed op niet-doel herbivoren.* Naast doel herbivoren waartegen de Bt-eigenschap aan de plant wordt toegevoegd (lepidopteren, coleopteren, dipteren) zijn er verscheidene andere herbivoren waarvoor slechts geringe informatie omtrent de effecten van toxinen beschikbaar is (Chapman & Hoy, 1991; Dutton *et al.*, 2002). Indien de toxinen niet binden aan receptoren in de middendarm van deze niet-doel herbivoren is het mogelijk dat accumulatie plaatsvindt en daarna een negatief effect teweeg brengt in hogere trofische niveaus (carnivoren) die wel tot de genoemde orden van insecten behoren.
- *Concentratie-effecten.* Onderzoek naar de effecten van transgene cultivars met een verschillende mate van expressie van Bt-toxinen heeft, zoals verwacht, aangetoond dat lijnen met hogere concentraties aan toxinen hogere mortaliteit veroorzaken onder zowel doel- als niet-doel herbivoren (Hellmich *et al.*, 2001; Stanley-Horn *et al.*, 2001). Daarnaast worden lijnen met hoge mate van expressie toegepast om resistentie-ontwikkeling tegen te gaan (Gould, 2000). Hoe, in vergelijkend opzicht, multitrofe interacties beïnvloed worden door lijnen met verschillende concentraties aan Bt-endotoxinen is voornamelijk nog onbekend, al ligt het in de verwachting dat hogere expressie grotere gevolgen heeft voor de doorgifte van toxinen in het voedselweb. Hogere concentraties verhogen de kansen op ongewenste neveneffecten.

Leemtes in kennis: Er bestaat nog onvoldoende inzicht in a) de mate van accumulatie en persistentie van Bt-toxinen in niet-doel herbivoren en de gevolgen daarvan op hogere trofische niveaus; b) dosis-respons effecten met betrekking tot doel-organismen en niet-doel-organismen; c) de effecten van verschillende mate van expressie van Bt-toxinen op diffusie in en het functioneren van het voedselweb.

5.1.5. Procesdynamiek en lange termijn effecten

Behoudens de mechanistische aspecten van de interactie tussen transgene gewassen en de hogere trofische niveaus is er bijzonder weinig bekend over de invloed van Bt-toxinen op de populatiedynamica en populatiegenetica van zowel de doel- als niet-doel soorten in het 2^e t/m het 4^e trofische niveau. Kennis over de individuele interacties tussen soorten en hoe dit de doorgifte van toxinen beïnvloed is weliswaar belangrijke basiskennis. Zij is echter niet geschikt voor het inschatten van effecten van Bt-gewassen op populaties van herbivoren en hun antagonisten. Kennis hierover, en over de dynamiek van ecologische processen die bepalend zijn voor (secundaire) plaagvorming in het gewas is daardoor van groot belang. Juist een beter begrip omtrent deze processen en hun invloed op de dynamiek van populaties en hun genetische samenstelling zal een essentiële bijdrage leveren aan het inschatten van effecten van Bt-gewassen op langere termijn.

De samenstelling van de levensgemeenschap in een gewas is van invloed op populatiedynamica van de soorten in de levensgemeenschap (Kareiva, 1990).; Ives *et al.*,

2000). Mechanistische kennis over de effecten van transgene planteneigenschappen op individuele leden van de levensgemeenschap kan leiden tot hypothesen over de effecten van een transgeen gewas op de levensgemeenschap. Quantitatieve analyses van de samenstelling van het voedselweb, uitgevoerd over meerdere generaties kunnen belangrijke inzichten geven in de effecten van veranderde planteneigenschappen op de dynamiek van een levensgemeenschap. Moderne technieken voor de quantitative analyse van een voedselweb zijn zeer geschikt voor een vergelijkende aanpak (Oamcini *et al.*, 2001).

Leemtes in kennis: a) Het bestaande onderzoek (veelal mechanistisch van aard) levert geen inzicht in de invloed van Bt-toxinen op de populatiedynamica en genetische samenstelling van zowel doel- als niet-doel insecten; b) Er is geen kennis van de effecten van een transgen op de samenstelling van een levensgemeenschap.

5.1.6. Interactie met (half) natuurlijke ecosystemen

Aangezien onderzoek tot op heden zich met name gericht heeft op mechanistische aspecten is er, met uitzondering van een serie publicaties omtrent de effecten van Bt-mais stuifmeel op de Monarch vlinder (*Danaus plexippus*) in Amerika (zie Gatehouse *et al.*, 2002 voor review), zeer weinig informatie beschikbaar over de effecten van Bt-gewassen op niet-doel organismen, en met name op soorten die voorkomen in (half) natuurlijke ecosystemen. De waargenomen effecten op de Monarch vlinder (waarbij consumptie van Bt-mais stuifmeel plaatsvond op de natuurlijke waardplant (Euphorbiaceae) bleken afhankelijk van de hoeveelheid stuifmeel op de plant en concentraties van Bt-toxinen daarin. Slechts één cultivar (event 176) leidde tot aanzienlijke mortaliteit van Monarch larven. Dit voorbeeld laat echter zien dat effecten van Bt-gewassen in aangrenzende ecosystemen te verwachten zijn. Voor de Nederlandse situatie is het dan juist van belang om, gezien de kleinschaligheid van gewasproductie, de interactie van Bt-gewassen met niet-doel soorten in de (half) natuurlijke omgeving nader te bestuderen. Met name verdienen soorten die behoren tot de orden van insecten waartegen Bt-toxinen toegepast worden speciale aandacht. Verscheidene (zeldzame) vlindersoorten in Nederland zijn gebonden aan een specifieke leefomgeving en daarmee vaak aan geografisch geïsoleerde plekken. Diverse keversoorten functioneren als predatoren van planteneters in natuurlijke en landbouwecosystemen. De introductie van Bt-toxinen (bijvoorbeeld via stuifmeel) daarin kan mogelijk gevolgen hebben voor het voortbestaan van zulke soorten en het ligt in de verwachting dat dit de publieke opinie t.a.v. Bt-gewassen sterk zal negatief zal beïnvloeden. Inzake risicobeoordeling zal dus de specifieke locatie waarvoor toepassing van Bt-gewassen wordt aangevraagd, in relatie tot de waarde van de natuurlijke omgeving (bijv. een natuureservaat) van belang zijn. Daarnaast echter zal het toepassen in Nederland van Bt-gewassen die een sterk negatief effect hebben op waardevolle soorten leiden tot nog verdere versnippering van een levensvatbaar habitat. Dit kan ernstige gevolgen hebben voor het voortbestaan van dergelijke soorten (Kruess & Tschardt, 1994).

Naast het specifiek zijn van de Nederlandse situatie in termen van schaal (een relatief grotere interactie met de omgeving) is ook de relatief grote hoeveelheid oppervlaktewater in Nederland ter sprake gekomen en dienen mogelijke uitspoeling en verspreiding van Bt-toxinen en mogelijke effecten op waterarthropoden in acht te worden genomen.

Bovenstaande mogelijk negatieve gevolgen op soorten in aangrenzende (half)natuurlijke ecosystemen en de verstoring die daarop kan volgen in natuurlijke leefgemeenschappen verdienen speciale aandacht. Dit maakt het opstellen van regels voor beheersbaarheid (terugdringen of volledig stoppen van waargenomen negatieve effecten) noodzakelijk.

Leemtes in kennis: In Nederland zijn de ecologische effecten als gevolg van de (relatief) grotere interactie van een Bt-gewas met specifieke organismen (bijv. vlinders, kevers) op de functionele biodiversiteit in zijn algemeenheid in de (half) natuurlijke omgeving (schaal, oppervlakte water) onbekend.

5.1.7. Horizontale genoverdracht

Het risico op horizontale genoverdracht, waarbij een biotechnologisch toegevoegde eigenschap tot expressie komt in een niet-doel organisme, kan vergaande consequenties hebben voor wat betreft het functioneren van dat organisme binnen een leefgemeenschap. Dit is afhankelijk van de fitness effecten van de nieuwe eigenschap op het niet-doel organisme. Uitkruising van de Bt-eigenschap naar wilde verwanten kan derhalve de ecologie van multitrofe interacties in deze soorten ingrijpend beïnvloeden. De directe gevolgen van uitkruising worden hier niet besproken, maar de invloed daarvan op multitrofe interacties is van belang – doch vooralsnog onbekend. In meerdere gesprekken is naar voren gekomen dat juist het in kaart brengen van deze effecten kan bijdragen aan het inschatten van de ecologische risico's daarvan.

De kans op overdracht van DNA van planten naar micro-organismen wordt als bijzonder klein beschouwd (EPA, 2000). Echter, aangezien het Bt-construct haar origine vindt in een bodem micro-organisme verdient juist het potentieel voor overdracht naar andere micro-organismen aandacht. Plantaardig DNA (in afgestorven plantendelen, stuifmeel of wortellexudaten) kan maanden of zelfs jaren aanwezig blijven in de bodem (Gebhard & Smalla, 1999; Paget *et al.*, 1998) en daardoor de kans op interactie met bodem-(micro)organismen verhogen. Hoe de consumptie van Bt-plant materiaal de microbiële flora in (de middendarm van) bodemarthropoden kan beïnvloeden en of er eventueel overdracht van genetisch materiaal kan plaatsvinden, is vooralsnog onbekend.

Leemte in kennis: Horizontale genoverdracht van de Bt-eigenschap naar verwante wilde soorten zal gevolgen hebben voor de ecologie van multitrofe interacties. De mate waarin het functioneren van natuurlijke systemen daardoor verandert is onbekend. Er is weinig bekend over horizontale overdracht van Bt-DNA van dood plantenmateriaal naar bodem organismen. De kans daarop wordt slechts als 'zeer gering' omschreven.

5.2. Belangrijke ecologische vragen

Naast de algemene dan wel specifieke hiaten in kennis zoals hierboven beschreven zijn ook andere ecologische vragen besproken in relatie tot Bt-gewassen en hun invloed op multitrofe interacties. Desalniettemin zijn niet alle onderwerpen die van belang zijn aan bod gekomen. De onderstaande lijst van ecologische vragen, voortgekomen uit de hier gepresenteerde enquête, dient daarom te worden samengevoegd met de bevindingen van de voorafgaande deskstudie (Groot & Dicke, 2001; hieronder aangegeven met '*'):

Expressie van Bt-toxinen

1. Kan selectieve expressie van Bt-toxinen in slechts die delen van de plant waar herbivorie door doel-insecten plaatsvindt negatieve effecten op niet-doel insecten verminderen of wegnemen?
2. Wat zijn de gevolgen van expressie van meerdere Bt-toxinen in één plant op multitrofe interacties? Kan dit het optreden van resistentie verminderen? Hoe verhouden de gevolgen hiervan zich t.o.v. planten met expressie van slechts één Cry-eiwit?
3. Hoe beïnvloedt de expressie van (hoge doses van) Bt-toxinen of de expressie van meerdere toxinen de kringloop van nutriënten en basale fysiologische processen van de plant? In welke mate wordt het aanwenden van natuurlijke afweermechanismen door de plant beïnvloed door toxineproductie? Kan selectieve expressie (zie 1.) de invloed op deze processen verminderen?
4. Verhoogt de toepassing van verschillende Bt-toxinen in diverse (aangrenzende) gewassen het risico op ontwikkeling van kruis-resistentie?

Bt-toxinen: Blootstelling, accumulatie en persistentie

1. Wat zijn de effecten van het vrijkomen van Bt-toxinen in de bodem op micro-organismen, nematoden, schimmels, arthropoden en hogere organismen (bijv. regenwormen) en hoe beïnvloedt dit het functioneren van de plant en bovengrondse ecologie van multitrofe interacties in vergelijking met gangbare bestrijdingsmethoden, inclusief de bespuiting met Bt-toxinen?
2. In hoeverre treedt er accumulatie en persistentie van Bt-toxinen op in de bodem en niet-doel herbivoren en wat zijn de gevolgen daarvan voor het functioneren van hogere (boven- en ondergrondse) trofische niveaus? Hoe verhouden accumulatie en persistentie in zowel doel- als niet-doel organismen zich t.o.v. de Bt-toxine concentraties in de plant?
3. Wat zijn de effecten van verschillende expressieniveaus van Bt- toxinen op diffusie in en het functioneren van het voedselweb?

Populatiodynamica en –genetica

1. Hoe verandert de aanwezigheid van de Bt-eigenschap de populatiodynamica van zowel doel- als niet-doel organismen en hoe wordt de populatiegenetische

samenstelling daarvan beïnvloed – t.o.v. soortgelijke veranderingen bij toepassing van gangbare (biologische/chemische dan wel geïntegreerde bestrijding of resistentieverdeling) plaagbestrijding?

2. Hoe verandert de samenstelling van een leefgemeenschap bij aanwezigheid van de Bt-eigenschap t.o.v. veranderingen in samenstelling van gemeenschappen waarin gangbare plaagbestrijding plaatsvindt?

Interactie van het Bt-gewas met (half) natuurlijke ecosystemen

1. Hoe belangrijk zijn de effecten van Bt-toxinen op organismen en het functioneren van leefgemeenschappen in aangrenzende (half)natuurlijke ecosystemen in vergelijking met effecten die daarbinnen optreden bij gangbare plaagbestrijding? Hoe verhouden deze effecten zich in relatie tot de toe- of afname van biodiversiteit in aangrenzende systemen?
2. Worden niet-doel organismen in (half)natuurlijke ecosystemen in hogere of mindere mate beïnvloed (vanwege kleinschaligheid en het voorkomen in oppervlaktewater) door de aanwezigheid van Bt-toxinen in vergelijking met gangbare plaagbestrijding?
3. Hoe wordt de ecologie van multitrofe interacties in natuurlijke (verwante) soorten beïnvloed indien uitkruising van de Bt-eigenschap optreedt? Wat zijn de effecten daarvan op zulke leefgemeenschappen?
4. Wat zijn de ecologische gevolgen van het overspringen van de Bt-eigenschap van de plant naar bodem-(micro)organismen?

*Bt-resistentie**

1. Welke ecologische factoren dragen bij aan het ontwikkelen van Bt-(kruis)resistentie?
2. Hoe wordt ontwikkeling van Bt-resistentie in doel insecten beïnvloed door interacties met hogere trofische niveaus?
3. Hoe stabiel is de verworven resistentie en welke strategieën kunnen worden aangewend om Bt-resistentie terug te dringen?

5.3. Modelsysteem en referentiekader

Aan de hand van de beschrijving van een 'ideaal' 1^e trofisch niveau zoals weergegeven in hoofdstuk 4 werd de geïnterviewden verzocht een modelsysteem aan te geven waarvan de multitrofe redelijk tot goed bekend is, en waaraan de ecologische vragen die naar voren kwamen (zie 5.2.) bestudeerd kunnen worden. In vrijwel alle gesprekken kwam koolzaad (*Brassica napus*) naar voren. De multitrofe van dit systeem is goed bekend, en dit gewas is door meerdere onderzoeksgroepen reeds als model gebruikt voor studies naar multitrofe interacties. Daarnaast is de multitrofe van dit systeem voldoende complex om zowel effecten op het 2^e niveau (de herbivoren (bijv. *Pieris/Mamestra* soorten, aardvlooien etc.) als op niet-doel herbivoren, carnivoren als bestuivende insecten te bestuderen (zie bijv. Schuler *et al.*, 2001). Juist de relatief kleine schaal waarop koolzaad verbouwd wordt in Nederland maakt het mogelijk om de ecologische effecten van Bt- koolzaad op een

beperkt areaal te bestuderen zonder het risico van overspringen van effecten naar grote gebieden (zoals bij een windbestuiver als maïs te verwachten is). Dit gewas leent zich bovendien uitstekend voor studies onder zowel laboratorium, kas- als veldomstandigheden. Tot slot leent het gewas zich ook voor studies naar uitkruising en effecten op het bodemecosysteem. Als nadelen werd gewezen op de effecten van de plant op bodemorganismen en de langdurige aanwezigheid van zaad in de bodem.

Een belangrijk onderdeel van de discussie ging over de vraag waarmee multitrofe interacties in Bt-koolzaad zouden moeten worden vergeleken. Hierbij kwamen een aantal belangrijke punten aan de orde:

- *Expressie van eigenschappen.* De gangbare cultivars van koolzaad hebben al een bepaalde mate van veredeling doorgemaakt, en afhankelijk van de keuze van een bepaald ras zal de mate van bijvoorbeeld de natuurlijke afweer verschillen. Het is daarom van groot belang dat afbakening van de grenzen voor wat betreft de te bestuderen effecten bekend is door deze bij verscheidene rassen te vergelijken. Alleen op deze wijze zullen de effecten die waargenomen worden in het Bt-gewas in kwantitatief opzicht te vergelijken zijn met isogene lijnen.
- *Traditionele resistentie.* Aangezien de plant grondstoffen aanwendt om afweer tegen herbivoren te bewerkstelligen, kunnen effecten worden waargenomen in een Bt-gewas die niet als zodanig direct gerelateerd zijn aan de aanwezigheid van het Bt-construct in het genoom. Vergelijkend onderzoek aan een Bt-cultivar t.o.v. een ras met ingekruiste resistentie is daarom van belang.
- *Ondergrondse effecten.* Juist voor wat betreft de interactie tussen bodemorganismen (microflora, schimmels en bodem arthropoden) en de plant werd de aanwezigheid van een knol als gewenst geacht. Koolraap (*B. n. napobrassica*) voldoet aan deze eis.
- *Relatie tot natuurlijke / verwilderde systemen.* Om tot een goede inschatting van de potentiële ecologische effecten van Bt- gewassen op natuurlijke systemen te komen dienen simultaan deze effecten en interacties met wilde cruciferen te worden vergeleken. Als voorbeelden zijn zwarte mosterd (*B. nigra*), kool (*B. oleracea*), en zandraket (*Arabidopsis thaliana*) genoemd.
- *Conventionele bestrijding.* Het tegengaan van schade door plaaginsecten middels chemische, biologische of geïntegreerde bestrijdingsmethoden heeft op zichzelf een invloed op multitrofe interacties in het gewas, en kan ecologische gevolgen met zich meebrengen (zoals het ontstaan van secundaire plagen door het wegvallen van carnivoren na bespuiting). Deze effecten dienen te worden afgewogen t.o.v. de mogelijke ecologische effecten die transgene gewassen teweeg brengen in multitrofe systemen en vergelijkend onderzoek is daardoor gewenst.

5.4. Aandachtsvelden voor onderzoek

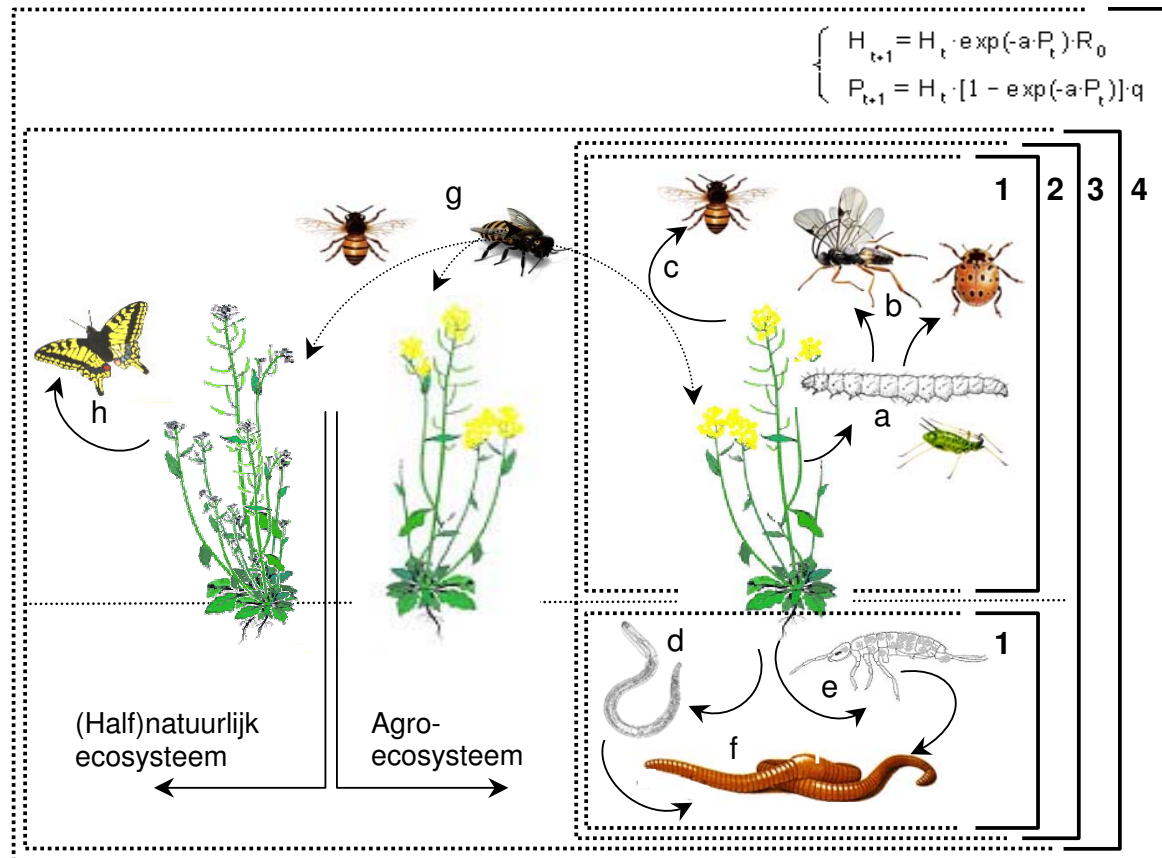
De beschrijving van belangrijke ecologische vragen (5.2.) en het naar voren komen van een modelsysteem waarmee deze vragen kunnen worden bestudeerd (5.3.) is te herleiden tot het definiëren van vier aandachtsvelden voor onderzoek dat specifiek kan bijdragen aan het inschatten van ecologische effecten van Bt-koolzaad en Bt-Koolraap op multitrofe interacties, zowel binnen het gewas als bij natuurlijke verwanten (Figuur 1).

Effecten op individuele interacties. Dit aandachtsveld richt zich puur op de effecten veroorzaakt door directe interactie van Bt-toxinen met de verschillende trofische niveaus (doel- en niet-doel herbivoren (zowel onder- als bovengronds), bestuivende insecten, parasitoïden en predatoren, en andere niet-doel organismen (bijv. regenwormen)) en invloeden op de fysiologie, nutriëntenhuishouding en kringloopprocessen in de plant. Blootstelling aan Bt-toxinen, accumulatie en persistentie, en het doorgeven van toxinen in het voedselweb staan centraal in dit aandachtsveld.

Relatie tussen onder- en bovengrondse effecten. Centraal in dit aandachtsveld staan de indirecte gevolgen van de aanwezigheid van Bt-toxinen in de plant. Specifiek worden de gevolgen van ondergrondse effecten op het functioneren van bovengrondse multitrofe interacties, en *vice versa*, bekeken voor belangrijke sleutelsoorten die voortkomen uit studies naar de effecten van Bt-toxinen op individuele interacties.

‘Community’ ecologie. Dit aandachtsveld richt zich op de interactie van de Bt-plant met haar directe omgeving, inclusief wilde verwanten en soorten in aangrenzende (half)natuurlijke systemen. Naast sleutelsoorten die interactie kennen met het Bt-gewas komen binnen dit aandachtsveld ook sleutelsoorten aan bod die interacteren met wilde varianten.

(Simulatie)modellen en studies op populatieniveau. Kennis omtrent de effecten van Bt-toxinen op individuele interacties, en hoe deze multitrofe interacties in zowel het Bt-gewas als aangrenzend ecosysteem beïnvloeden, kan worden toegepast om effecten op de populatiedynamica en populatiegenetische samenstelling van doel en niet-doel organismen kwantitatief te omschrijven. Inzicht in de processen die de dynamiek van populaties en hun genetische samenstelling beïnvloeden dient vervolgens als basis voor het ontwikkelen van (simulatie)modellen. Deze modellen dienen bij te dragen aan het inschatten van effecten op de lange termijn en op grotere schaal.



Figuur 1. De vier aandachtsvelden voor ecologisch onderzoek naar multitrofe interacties in Bt-gewassen. De gevolgen van directe blootstelling aan, en ophoping van Bt-endotoxinen in belangrijke doel en niet-doel herbivoren (a), carnivore antagonisten (b) en bestuivende insecten (c), en belangrijke nematoden, schimmels, bacteriën (d), arthropoden (e) en hun ondergrondse predatoren (f) omvatten het primaire aandachtsveld (niveau 1). Het secundaire aandachtsveld omvat studies naar de invloed van ondergrondse effecten op de functionaliteit van bovengrondse interacties en vice versa (niveau 2). Op tertiair niveau worden de interacties tussen Bt-planten en de verschillende actoren in de directe omgeving besudeerd ('Community ecologie; niveau 3). Dit omvat ook studies naar de mogelijke effecten op (ver)wilde(rde) en verwante plantensoorten (g) en de soorten die daarvan afhankelijk zijn (h). Het meest geavanceerde (quartaire) niveau gebruikt inzicht verworven in de drie andere niveaus, in combinatie met gegevens over effecten van Bt-gewassen op de populatiedynamica en populatiegenetica van sleutelsoorten, als basis voor het simuleren van effecten (m.b.v. modellen) over langere tijd en op grotere schaal (niveau 4).

6. Bijdrage aan risicobeoordeling

De complexiteit van multitrofe interacties in gewassen en de leemtes in algemene en specifieke kennis omtrent de toevoeging van de Bt-eigenschap aan de plant maakt ook de risicobeoordeling voor wat betreft de mogelijke ecologische effecten complex. Aangezien niet iedere interactie van de vele organismen die een directe dan wel indirecte interactie met de plant hebben bestudeerd kan worden, en de rol die veel van deze (met name ondergrondse) organismen spelen in het plant-ecosysteem vooralsnog onbekend is, zal risicobeoordeling reductionistisch van aard moeten zijn. Daarnaast zal, in afwezigheid van volledige kennis van alle interacties, juist het referentiekader en de veranderingen in relatief opzicht t.o.v. het Bt-gewas als indicator dienen voor mogelijk ongewenste effecten, en in die zin bijdragen tot risicobeoordeling.

In algemene zin behelst risicobeoordeling vier aspecten nl. 1) identificatie van ongewenste ecologische *effecten* ('hazard identification'), 2) de dosis-afhankelijkheid van zulke effecten ('dose-response evaluation'), 3) de omstandigheden die de mate van blootstelling beïnvloeden ('exposure assessment') en 4) risico-afbakening: het in kwantitatieve zin weergeven van de kans van optreden van ongewenste effecten in relatie tot een specifieke mate van blootstelling ('risk characterisation')(Natl Acad Sci, USA, 2000) . In beleidsmatig opzicht levert de combinatie hiervan inzicht in de mogelijke effecten die al dan niet als acceptabel kunnen worden beoordeeld. Momenteel zijn er twee manieren waarop dit gebeurt, namelijk middels 'risk assessment', gericht op het afwegen van risico's t.o.v. de voordelen, of middels het 'precautionary principle', waarbij het voorkómen van nadelige gevolgen de overhand neemt boven de mogelijke voordelen van toepassing. Het eerste 'model' wordt toegepast in Amerika, en heeft als voordeel dat de ingebruikname van transgene gewassen sneller verloopt zo lang de effecten minder ingrijpend of gelijk zijn aan bestaande methoden van plaagbestrijding. Het 'precautionary principle' bepaalt reeds het beleid in Zwitserland en Duitsland, en wordt in toenemende mate gehanteerd in andere Europese landen (Environ. Media Serv., 2000; Shelton *et al.*, 2002; Appell, 2001). Hierbij doet zich de vraag voor 'Hoeveel dient men minimaal te weten om toelating te verlenen?'.

Voor wat betreft multitrofe interacties in Bt-gewassen kunnen zowel de mogelijke effecten als de kans dat deze zich voordoen bestudeerd worden middels wetenschappelijk onderzoek binnen de vier hoofdthema's zoals aangegeven in hoofdstuk 5. Binnen deze hoofdthema's komen de identificatie en het monitoren van effecten naar voren die een directe bijdrage leveren aan risicobeoordeling.

1. *Effecten op individuele interacties*

De directe dan wel indirecte interactie tussen de verschillende trofische niveaus en de plant en de *significantie* daarvan leveren inzicht in de mate van doorgifte van Bt-toxinen tussen de verschillende niveaus, en zijn terug te brengen tot het beantwoorden van de volgende vragen:

- Welke soorten komen voor in het systeem (zowel onder- als bovengronds) en hoe komen zij in aanraking met de plant (direct dan wel indirect) en Bt-toxinen?;
- Hoe komen deze soorten voor in het systeem in temporeel en spatieel opzicht, en in welke dichtheden?

Een doelherbivoor die gedurende het hele groeiseizoen in grote dichtheden voorkomt zowel in het gewas als in het aangrenzend ecosysteem zal een veel hogere *significantie* scoren dan een carnivoor die voor korte duur en slechts af en toe in aanraking komt met het 2^e trofisch niveau in het gewas. Echter, deze significantie dient niet uitsluitend in de zin van dichtheid en mate van interactie met het gewas te worden beschouwd, maar ook in relatie tot de ecologische functie van soorten in het systeem (zie bijv. Rott & Godfray, 2000). Het is dus mogelijk om een rangschikking aan te brengen op basis van deze *significantie* (welke soorten, dichtheden in de tijd en ruimte, en ecologische functie) en al doende een aantal sleutelsoorten aan te wijzen die bestudeerd dienen te worden in de overige drie thema's.

2. *Relatie tussen ondergrondse en bovengrondse effecten*

Er is voldoende aanleiding om interacties die ofwel niet voor de hand liggen danwel naar voren komen tijdens studies op organisme of community niveau nader aandacht te schenken. De groeiende kennis omtrent de effecten van ondergrondse processen op de ecologie van bovengrondse multitrofie is een goed voorbeeld hiervan (van der Putten *et al.*, 2001). Naast de rol van de sleutelsoorten in het voedselweb behelst dit aandachtsveld ook de bredere invloed van het transgeen gewas in het ecosysteem middels bijvoorbeeld studies naar kringloopprocessen van nutriënten.

3. *'Community' ecologie*

De invloed van Bt-endotoxinen op sleutelsoorten, en hun interactie met andere organismen in de directe (zowel onder- als bovengrondse) omgeving van de plant, kan vervolgens worden gekwantificeerd in een breder kader, waarbij de effecten van blootstelling, accumulatie en persistentie van toxinen in de sleutelsoorten worden onderzocht t.o.v. soorten waarmee zij direct (bijvoorbeeld het 3^e trofisch niveau) dan wel indirect interacteren. Indien de interactie van een herbivoor met het Bt-gewas leidt tot hoge mortaliteit binnen een korte periode is de mate van *significantie* lager dan wanneer het effect van toxinen op een herbivoor over langer termijn plaatsvindt en ophoping van proteïnen de kans op blootstelling bij hogere of andere niveaus verhoogt. Opnieuw kan rangschikking plaatsvinden van de sleutelsoorten in de mate van belangrijkheid die hun interactie met toxinen heeft voor andere actoren in het voedselweb. Terugkoppeling naar identificatie van sleutelsoorten kan hier plaatsvinden, m.a.w. soorten die in eerste instantie niet van belang werden geacht kunnen later wel een belangrijke rol blijken te spelen, en dienen dan in mechanistisch opzicht te worden bestudeerd.

4. *(Simulatie) modellen en studies op populatieniveau*

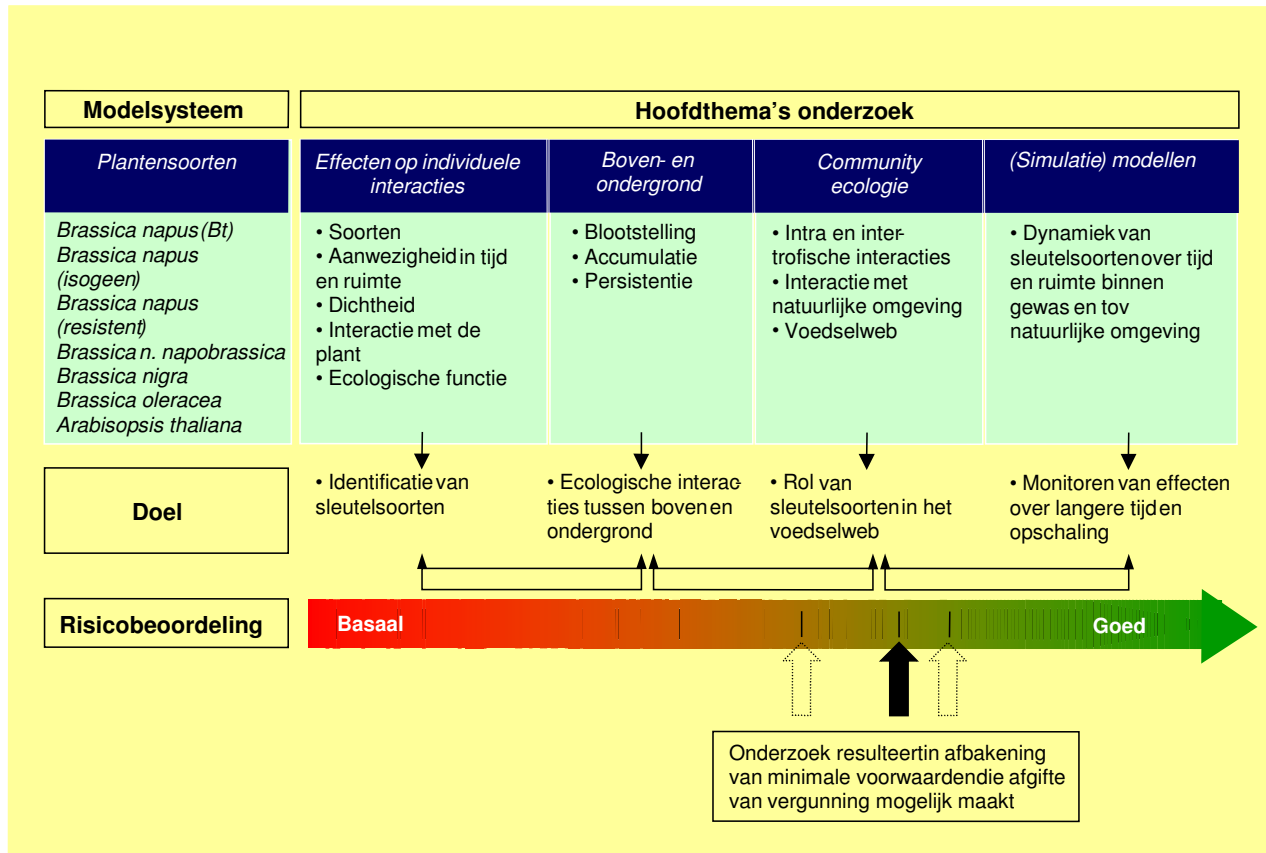
Middels een gelaagde benadering kan de complexiteit van multitrofe interacties in het transgene gewas zichtbaar worden en de rol van sleutelsoorten en belangrijke processen

gekwantificeerd worden en zo bijdragen tot de ontwikkeling van modellen. Hiermee kunnen de effecten van de Bt-eigenschap op processen in de plant en haar directe omgeving over langere tijd en op grotere schaal worden gesimuleerd. Middels gevoeligheidsanalyses kunnen modellen inzicht leveren in de belangrijkste processen en in die zin het schetsen van scenario's faciliteren.

Voor alle vier de hoofdthema's geldt dat onderzoek slechts dan een bijdrage aan risicobeoordeling kan leveren wanneer het gemeten effect in kwantitatief opzicht vergeleken kan worden met de spreiding van zo'n effect in het referentiesysteem en in die zin afbakening van het niveau dat acceptabel is, mogelijk maakt.

Schematisch is deze benadering weergegeven in Figuur 2. Risicobeoordeling, als resultante van alle mogelijke effecten en de kans op optreden daarvan, kan nu worden geclassificeerd van 'basaal' (enkel inzicht in de soorten in het systeem en hun interactie met de plant), tot 'goed' (inzicht in de langere termijn effecten).

Vooralsnog heeft het merendeel van onderzoek aan insectenresistentie in transgene gewassen plaatsgevonden binnen het hoofdthema 'Effecten op individuele interacties' en levert kennis hierover slechts een basale bijdrage aan de risicobeoordeling. Juist de overige drie hoofdthema's zijn, in toenemende mate, van belang voor het verbeteren van risicobeoordeling, en verdienen daarom meer aandacht.



Figuur 2. De vier hoofdthema's van onderzoek dat bijdraagt aan risk assessment voor wat betreft de ecologie van multitrofe interacties in Bt-gewassen.

7. Conclusies

Het bestrijden van plaaginsecten binnen een gewas, middels gangbare praktijken of toepassing van insectenresistente planten, zal vrijwel altijd een invloed hebben op multitrofe interacties in zo'n gewas en het aangrenzend ecosysteem. In 1992 werd in Amerika de toepassing van Bt-toxinen als directe bespuiting van het gewas equivalent gesteld aan het produceren van toxinen door de plant zelf (voor review van dit proces zie Shelton *et al.*, 2002). Dit besluit heeft het op de markt brengen van Bt-gewassen in Amerika aanzienlijk versneld, maar heeft vooralsnog niet bijgedragen aan inzicht in belangrijke vragen over de ecologische gevolgen van toepassing. Er zijn een aantal belangrijke verschillen tussen de twee manieren van het toepassen van Bt-toxinen die leiden tot extra vragen omtrent de gevolgen van het toepassen van Bt-toxinen in transgene gewassen (Groot & Dicke 2001). Veel van deze vragen zijn opnieuw in deze enquête naar voren gekomen.

Het tweeledig doel van deze enquête was a) inzicht verwerven in belangrijke ecologische vragen voor wat betreft multitrofe interacties in Bt-gewassen en b) het definiëren van aandachtsvelden voor onderzoek ter ondersteuning van een adequate risicobeoordeling bij toelatingsaanvragen. Verscheidene hiaten in algemene dan wel specifieke kennis (Vraag 1a/b) zijn naar voren gekomen en besproken in hoofdstuk 5.2. Net als in internationaal opzicht kwam de directe interactie van de verschillende niveaus met Bt-toxinen het meest ter sprake. Blootstelling van verscheidene groepen van doel- en niet-doel organismen, zowel onder- als bovengronds, en accumulatie en persistentie van toxinen in het voedselweb werd gezien als belangrijke graadmeter voor het inschatten van ecologische effecten. Er kwamen echter, naast deze puur intra- en intersoortspecifieke interacties een aantal andere zaken naar voren, zoals de koppeling tussen onder- en bovengrondse niveaus, de invloed van het Bt-gewas op de aangrenzende ecosystemen, en de afwezigheid van studies naar de populatiedynamica en –genetica van zowel doel- als niet-doel organismen. Ook dient hier de directe invloed van de Bt eigenschap op de fysiologie en nutriëntenhuishouding van de plant, gekoppeld aan het vermogen van de plant om haar natuurlijke afweermecanismen aan te wenden, genoemd te worden.

Een mogelijk modelsysteem (gewas) dat gebruikt kan worden ter bestudering van deze vragen, inclusief de voorwaarden waaraan zo'n modelsysteem zou moeten voldoen, is beschreven in hoofdstuk 5.3. (Vraag 2a/d). Bt-koolzaad danwel koolraap blijkt een ideaal modelgewas voor studies naar de invloed op van de Bt-eigenschap op multitrofe interacties. Het gewas is reeds genetisch gemodificeerd, wordt toegepast in de Nederlandse landbouw, heeft een voldoende mate van complexiteit (in multitroof opzicht) en leent zich ook voor studies naar uitkruising en bodem ecosystemen. De ecologische effecten die waargenomen worden in Bt-koolzaad en koolraap kunnen vergeleken worden met a) isogene lijn(en) (met gangbare bestrijding, chemisch, biologisch danwel geïntegreerd), b) isogene lijn(en) met ingekruiste resistentie, c) wilde cruciferen (*Brassica*, *Arabidopsis*) (Vraag 3b). Waargenomen effecten dienen getoetst te worden aan het voorkomen van dezelfde effecten in het referentiegewas. Het belang van deze metingen (Vraag 3c) kan

slechts dan bijdragen aan risicobeoordeling wanneer het mogelijk is in kwantitatief opzicht het effect te vergelijken met de variatie (opnieuw in kwantitatief opzicht) van dat effect in het referentiegewas en vooraf de grenzen waarbinnen effecten acceptabel zijn te definiëren.

De Nederlandse situatie kenmerkt zich door kleinschaligheid en relatief veel oppervlakte water (Vraag 3a), waardoor de interactie van het Bt-gewas met de (half)natuurlijke omgeving, en de diffusie van (gebonden) toxinen in het milieu mogelijk wordt verhoogd. Er zijn geen specifieke onderzoekstechnieken naar voren gekomen (Vraag 3d) die ontwikkeld dienen te worden om de gestelde vragen te kunnen onderzoeken of die specifiek nodig zijn voor onderzoek aan Bt-gewassen in de Nederlandse context. Echter, het belang van ontwikkeling van methodes om lage concentraties van Bt-toxinen te kunnen detecteren in het milieu en zowel doel- als niet-doel organismen, werd onderstreept.

De belangrijke ecologische vragen die aan bod zijn gekomen in de deskstudie (Groot & Dicke, 2001), in combinatie met de vragen die naar voren zijn gekomen in deze enquête, kunnen allen ondergebracht worden in vier aandachtsvelden voor onderzoek nl. a) effecten op individuele interacties, b) relatie tussen ondergrondse en bovengrondse effecten, c) community ecologie en d) ontwikkelen van (simulatie) modellen en studies op populatieniveau.

Binnen de Nederlandse academische en institutionele wereld worden velerlei ecologische vraagstukken bestudeerd die direct kunnen bijdragen aan het verwerven van inzicht in mogelijke ecologische gevolgen van toepassing van Bt-gewassen op multitrofe interacties. Alle geënquêteerden toonden interesse en bereidheid tot deelname in een onderzoeksprogramma dat zich richt op de materie besproken in dit rapport.

8. Aanbevelingen voor een onderzoeksprogramma

In de nabije toekomst zal de Nederlandse overheid steeds vaker geconfronteerd worden met de mondiale toename in toepassing van genetisch gemodificeerde gewassen en dient het beleid t.a.v. (experimentele) toelating te worden afgestemd op een helder inzicht in de landbouwkundige, natuurlijke en maatschappelijke gevolgen daarvan.



(Bron: Marvier, 2001)

Een onderzoeksprogramma dat zich richt op het beantwoorden van belangrijke ecologische vragen die de toepassing van insecten-resistente transgene gewassen met zich meebrengt zal zich dienen te richten op een viertal hoofdthema's:

1. **Effecten van Bt-toxinen op individuele interacties binnen en tussen soorten van de verschillende trofische niveaus**
2. **Relatie tussen onder- en bovengrondse effecten**
3. **'Community' ecologie**
4. **(Simulatie) modellen en studies op populatieniveau**

Het onderzoek dat reeds internationaal is uitgevoerd laat zien dat versnippering van aandacht voor specifieke deelonderwerpen, met name gericht op de effecten van toxinen op individuele interacties tussen soorten weliswaar wordt meegewogen in risicobeoordeling (bijv. in Amerika), maar dat juist ecologische gevolgen op populatieniveau en t.a.v. natuurlijke systemen nauwelijks aan bod zijn gekomen. De houding 'heeft dit een effect op dat' en 'zo nee, dan kunnen we toepassen', is niet afdoende om de ecologische gevolgen van toepassing van Bt-gewassen over langere termijn te voorzien.

Effecten op individuele interacties binnen en tussen soorten blijven een belangrijk onderdeel vormen van studies naar de gevolgen van Bt-toxinen op multitrofe interacties. De uitdaging ligt echter in het vertalen van deze interacties naar effecten op hogere niveaus (hogere trofische niveaus, populaties, het voedselweb, en tenslotte de leefgemeenschap), en dan over langere termijn (middels modelstudies). Het bereiken van dit vergevorderd inzicht in de gevolgen van toevoeging van de Bt-eigenschap aan

gewassen op leefgemeenschappen over langere tijd en op grotere schaal zal de beste bijdrage kunnen leveren aan risicobeoordeling (zie Figuur 2, blz. 28) en dus afgifte van vergunningaanvragen kunnen faciliteren. Het ligt daarom voor de hand dat slechts een programma van hoogwaardig geïntegreerd en multidisciplinair karakter dit niveau van inzicht kan bewerkstelligen.

Het centraal stellen van een modelsysteem en referentiekader waaraan deze ecologische vragen kunnen worden bestudeerd verhoogt de mogelijkheid tot integratie van onderzoek binnen de vier hoofdthema's. Bt-koolzaad en -raap, met als referentiekader isogene lijnen, al dan niet met traditioneel ingekruiste resistentie, en/of (ver)wilde(rde) cruciferen is tijdens deze enquête naar voren gekomen als een geschikt gewas voor ecologische studies binnen de hoofdthema's.

Gezien het relatief klein aantal instellingen in Nederland waar onderzoek aan dit thema kan plaatsvinden is wellicht het vormen van een consortium (of enkele consortia) een doelgerichte wijze om integratie van de thema's en multidisciplinair onderzoek te bewerkstelligen. Tijdens de interviews is deze aanpak meerdere keren voorgesteld, alsmede het uitvoeren van multidisciplinair onderzoek op een centrale locatie. De keuze voor een specifiek gewas, en slechts een gering aantal (wilde) soorten en lijnen die als referentiekader kunnen dienen zal verdere integratie van kennis bespoedigen.

9. Dankwoord

Dit onderzoek werd gefinancierd door de Commissie Genetische Modificatie (COGEM). Allereerst gaat onze dank uit naar de geënquêteerden (Annex 1) voor hun tijd en bijdrage aan het tot stand komen van dit rapport. Een speciaal woord van dank voor de begeleidingscommissie voor hun bijdrage aan het opstellen van de enquête vragen en suggesties en opmerkingen tijdens de tussentijdse evaluatie. Tenslotte bedanken we de subcommissie Landbouw van de COGEM voor de geboden mogelijkheid om de bevindingen van deze studie mondeling te kunnen presenteren tijdens het overleg van 17 december 2002.

10. Literatuur

- Aldhous P, 2002. More heat than light. *Nature*, 420, 730-731.
- Appell D, 2001. The new uncertainty principle. *Am. Sci.*, 89, 18-19.
- Baum JA, Johnson TB & Carlton BC, 1999. *Bacillus thuringiensis*: natural and recombinant bioinsecticide products. *Biopesticides: use and delivery*. FR Hall & JJ Menn. New Jersey, Humana Press, 189-209.
- Bruinsma M, Kowalchuk GA. & van Veen JA, 2002. Effects of genetically modified plants on soil ecosystems. NIOO-KNAW. 64 + XIV pp.
- Chapman MH & Hoy MA, 1991. Relative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* to the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) and its predator *Metaseiulus occidentalis* (Nesbit)(Acari, Tetranychidae and Phytoseiidae). *J. Appl. Entomol.*, 111, 147-154.
- Crickmore N, 2001. http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/index.html.
- DeBach P, 1974. *Biological control by natural enemies*. London, Cambridge University Press.
- Dicke M, 1999. Direct and indirect effects of plants on performance of beneficial organisms. *Handbook of pest management*. J. R. Ruberson. New York, Marcel Dekker, 105-153.
- Dicke M & Van Loon JJA., 2000. Mini review: Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. *Entomol. Exp. Appl.*, 97, 237-249.
- Dutton A, Klein H, Romeis J & Bigler F, 2001. Uptake of Bt-toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for the predator *Chrysoperla carnea*. *Ecol. Entomol.*, 27, 441-447.
- Environ. Media Serv., 2000. Reporters' guide: genetic engineering in agriculture. http://www.ems.org/food/media_guide.html
- Fitt GP & Wilson LJ, 2000. Genetic engineering in IPM: *Bacillus thuringiensis* cotton. *Emerging Technologies for Integrated Pest Management*. GG Kennedy & TB Sutton. St Paul, Minnesota, APS Press, 108-125.
- Gebhard F & Smalla K, 1999. Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiol.*, 28, 261-272.
- Gould F, 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: Integrating pest genetics and ecology. *Annu. Rev. Entomol.*, 43, 701-726.
- Gould F, 2000. Testing *Bacillus thuringiensis* refuge strategies in the field. *Nature Biotech.*, 18, 266-267.
- Groot A & Dicke M, 2001. *Transgenic crops in an agro-ecological context: Multitrophic effects of insect-resistant plants*. Wageningen University & Research Centre. 76 pp.
- Groot A & Dicke M, 2002. Insect-resistant transgenic plants in a multitrophic context. *Plant J.*, 31, 387-406.
- Hellmich RL, Siegfried BD, Sears MK, Stanley-Horn DE, Daniels MJ, Mattila HR, Spencer T, Bidne KG & Lewis LC, 2001. Monarch larvae sensitivity to *Bacillus thuringiensis*-purified proteins and pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 11925-11930.

- Höfte H & Whitely HR, 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.*, 53, 242-255.
- Ives AR, Klug JL, Gross K, 2000. Stability and species richness in complex communities. *Ecol. Lett.*, 3, 399-411.
- James C, 2000. Global status of commercialised transgenic crops: 2000. ISAAA Briefs 21, Preview. ISAAA, Ithaca, NY.
- Kareiva PM, 1990. Stability from variability. *Nature*, 344, 111-112.
- Kota MH, Daniell H, Varma S, Garczynski SF, Gould F & Moar WJ, 1999. Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 1840-1845.
- Kruess A. & Tscharntke T, 1994. Habitat fragmentation, species loss, and biological control. *Science*, 264, 1581-1584.
- Lotz LAP, de Vriend H, Schenkelaars JPM, Visser RGF, de Visser CLM, Gilissen LJWJ, Toussaint HAJM, Grashoff C, Dueck Th A & Meeldijk S (2002). Rapportage Agrogen 1: Vergelijking van teelten met en zonder transgene gewassen in relatie tot duurzame landbouw. *Plant Research International, Nota 199*. Wageningen.
- Marvier M, 2001. Ecology of transgenic crops. *Sci. Am.*, 89, 160-167.
- National Academy of Sciences, USA, 2000. Genetically modified pest-protected plants: Science and Regulation. Washington DC: Natl Acad. Press. 292 pp.
- Omacini M, Chaneton, EJ, Ghersa, CM & Muller, CB, 2001. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. *Nature*, 409, 78-81.
- Paget E, Lebrun M, Freyssinet G & Simonet P, 1998. The fate of recombinant plant DNA in soil. *Eur. J. Soil Biol.*, 34, 81-88.
- Palm CJ, Schaller DL, Donegan KK & Seidler RJ, 1996. Persistence in soil of transgenic plant-produced *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* δ -endotoxin. *Can. J. Microbiol.*, 42, 1258-1262.
- Pilcher CD, Rice ME, Higgins RA, Steffey KL, Hellmich RL, Witkowski J, Calvin D, Ostlie KR & Gray M, 2002. Biotechnology and the European Corn Borer: Measuring historical farmer perceptions and adoption of Bt corn as a pest management strategy. *J. Econ. Entomol.*, 95, 878-892.
- PrayCE, Huang J & Rozelle S, 2002. Five years of Bt cotton in China – the benefits continue. *Plant J.*, 31, 423-430.
- Raps A, Kehr J, Gugerli P, Moar WJ, Bigler F & Hilbeck A, 2001. Immunological analysis of phloem sap of *Bacillus thuringiensis* corn and the non-target herbivore *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) for the presence of Cry1Ab. *Mol. Ecol.*, 10, 525-533.
- Rott AS & Godfray H CJ, 2000. The structure of a leafminer-parasitoid community. *J. Animal Ecol.*, 69, 274-289.
- Roush RT, 1997. Managing resistance to transgenic crops. *Advances in insect control: the role of transgenic plants*. NB Carozzi & MG Koziel. London, Taylor & Francis Ltd., 271-294.

- Roush RT, 1998. Two toxin strategies for management of insecticidal transgenic crops: can pyramiding succeed where pesticide mixtures have not? *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 353, 1777-1786.
- Saxena D, Flores S & Stotzky G, 1999. Insecticidal toxin in root exudates from *Bacillus thuringiensis* corn. *Nature*, 402, 480.
- Saxena D & Stotzky G, 2001. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 33, 1225-1230.
- Schuler TH, Denholm I, Jouanin L, Clark SJ, Clark AJ & Poppy GM, 2001. Population-scale laboratory studies of the effect of transgenic plants on non-target insects. *Mol. Ecol.*, 10, 1845-1853.
- Shelton AM, Zhao J-Z & Roush RT, 2002. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annu. Rev. Entomol.*, 47, 845-881.
- Stanley-Horn DE, Dively GP, Hellmich RL, Mattila HR, Sears MK, Rose R, Jesse LCH, Losey JE, Obrycki JJ & Lewis L, 2001. Assessing the impact of Cry1Ab-expressing corn pollen on monarch butterfly larvae in field studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 11931-11936.
- Strauss SY, Rudgers JA, Lau JA & Irwin RE, 2002. Direct and ecological cost of resistance to herbivory. *Trends Ecol. Evol.*, 17, 278-285.
- US EPA, Off. Pestic. Programs, Biopesticides Pollut. Prev. Div., 2000. Biopesticides registration document; preliminary risks and benefits sections; *Bacillus thuringiensis* plant-pesticides. Washington, DC: US EPA.
- Tabashnik BE, 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.*, 39, 47-79.
- Tapp H, & Stotzky G, 1998. Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* in soil. *Soil Biochem.*, 30, 471-476.
- Van der Putten WH, Vet LEM, Harvey JA & Wäckers FL, 2001. Linking above- and below ground multitrophic interactions of plants, herbivores, pathogens, and their antagonists. *Trends Ecol. Evol.*, 10, 547-554.
- Whalon, ME & Norris DL, 1996. Resistance management for transgenic *Bacillus thuringiensis* plants. *Biotech. Developm. Monitor*, 29, 8-12.
- Yimin, D. & Mervis, J., 2002. China takes a bumpy road from the lab to the field. *Science*, 298, 2317-2318.

Annex 1

Geënquêteerde personen (in alfabetische volgorde):

1) Prof. Dr. Ir. Jaap **Bakker**

Laboratorium voor Nematologie,
Wageningen Universiteit en Research Centrum (WUR),
Binnenhaven 5,
Postbus 8123
6709 PD Wageningen
Tel: tel. +31 (0)317 48 31 37
Fax: +31 (0)317 48 42 54
Email: jaap.bakker@wur.nl

2) Dr. Hans E.N. **Bergmans**

RIVM / CSR / Bureau GGO
Antonie van Leeuwenhoeklaan 9
3721 MA Bilthoven
Tel: +31 (0)30 2744195
Fax: +31 (0)30 274 4463
Email: hans.bergmans@rivm.nl

3) Prof. Dr. Herman J.P. **Eijsackers**

Alterra,
Droevendaalsesteeg 3,
Postbus 47
6700 AA Wageningen
Tel: +31 (0)317 474 216
Fax: +31 (0)317 424812
Email: h.j.p.eijsackers@alterra.wag-ur.nl

4) Prof. Dr. Hans **de Kroon**

Experimentele Plantenoecologie,
Katholieke Universiteit Nijmegen,
Toernooiveld 1
Postbus 9010
6500 GL Nijmegen
Tel: +31 (0)24 365 3380
Fax: +31 (0)24 365 2409
Email: hdekroon@sci.kun.nl

5) Prof. Dr. Eddy **van der Meijden**

Insituut voor Evolutionaire en Ecologische Wetenschappen,
Rijksuniversiteit Leiden,

Sterrenwachtlaan 5,
Postbus 9516
2300RA Leiden
Leiden
Tel: +31 (0)71 527 5119
Fax: +31 (0)71 527 4900
Email: meijden@rulsfb.leidenuniv.nl

6) Dr. Ir. Wim H. **van der Putten**
Centrum voor Terrestrische Ecologie, NIOO-KNAW
Boterhoeksestraat 48,
6666 GA Heteren
Tel: +31 (0)26 479 1111
Fax: +31 (0)26 472 3227
Email: putten@cto.nioo.knaw.nl

7) Prof. Dr. Maurice W. **Sabelis**
IBED, sectie populatiebiologie,
Universiteit van Amsterdam,
Kruislaan 320, Amsterdam
Tel: +31 (0)20 525 7738
Fax: +31 (0)20 525 7754
Email: sabelis@bio.uva.nl

8) Prof. Dr. Nico M. **van Straalen**
Vrije Universiteit
Faculty of Earth and life Sciences
Institute of Ecological Science
Department of Animal Ecology
De Boelelaan 1087
1081 HV Amsterdam
Tel. +31 (0)20 444 7070
Fax: +31 (0)20 444 7123
Email: straalen@bio.vu.nl

9) Prof. Dr. Louise E.M. **Vet**
Directeur Netherlands Institute of Ecology (NIOO-KNAW)
Villa 'Vijverhof'
Rijksstraatweg 6, Nieuwersluis
Postbus 1299
3600 BG Maarssen
Tel: +31 (0)294 23 93 12/23 93 00
Fax: +31 (0)294 23 20 78
Email: l.vet@nioo.knaw.nl

Begeleidingscommissie:

1) Dr. Willem A. **Brandenburg**

Voorzitter van de Subcommissie Landbouw van de Cogem
Plant Research International
Droevendaalsesteeg 1
Postbus 16
6700 AA Wageningen
Tel: +31 (0)317 476 848
Fax: +31 (0)317 418 094
Email: w.a.brandenburg@plant.wag-ur.nl

2) Dr. Arjen **Biere**

NIOO-KNAW Centrum voor Terrestrische Ecologie
Boterhoeksestraat 48
P.O. Box 40
6666 ZG Heteren
Tel: +31 (0)26 4791111
Fax: +31 (0)26 4723227
Email: a.biere@nioo.knaw.nl

3) Dr. Cynthia P.E. **van Rijn**

Coördinator Subcommissie Landbouw van de Cogem
Commissie Genetische Modificatie
Antonie van Leeuwenhoeklaan 9
Postbus 578
3720 AN Bilthoven
Tel: 030-2742449
Fax: 030-2744461
E-mail: Cynthia.vanRijn@cogem.net of info@cogem.net

Annex 2. Presentatie en Vragenlijst

Presentatie van vragen

Openingsdia – presentatie van onderwerp en uitvoerders van de studie. Algemene inleiding over het onderwerp.

Multitrofe interacties in genetisch gemodificeerde gewassen


Een enquête ter identificatie van belangrijke aandachtspunten voor ecologisch onderzoek

Bart GJ Knols & Marcel Dicke

WAGENINGEN UR


Presentatie Cogem, begeleidingscommissie en doelstellingen van de studie.

1. Opdrachtgever:

 Dr. Willem Brandenburg (Cogem)
Dr. Arjen Biere (NIOO)
Dr. Cynthia van Rijn (Cogem)


2. Doelstellingen:

1) Faciliteren van de beoordeling van vergunning aanvragen bij de Cogem voor toepassing van Bt gewassen: wat zijn de belangrijkste ecologische vragen?

2) Definieren van aandachtvelden voor onderzoek aan Bt gewassen ter initiatie van een nieuw onderzoeksprogramma binnen NWO 

Inleiding en bespreking van deskstudie Groot & Dicke (2001).

3. Aanpak:

 Deskstudie Groot & Dicke, 2001; Groot & Dicke, 2002: *Plant Journal*, 31, 387-406

22 aanbevelingen voor verder onderzoek

↓

Enquete onder vooraanstaande Nederlands ecologen

↓

Verslag

Definitie van zaken waarin deskstudie Groot & Dicke geen inzicht geven.

4. Geen inzicht in:

- In hoeverre zijn de resultaten van gedane studies (veelal buiten Nederland) van belang voor en vergelijkbaar met de Nederlandse land- en tuinbouw;



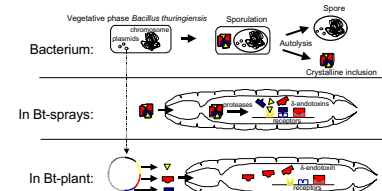
- In hoeverre kan de gedane literatuurstudie direct bijdragen aan de beoordeling van vergunningaanvragen bij de COGEM voor toepassing van transgene gewassen in Nederland;

- Zijn er specifieke situaties binnen de Nederlandse land- en tuinbouw in relatie tot de toepassing van transgene gewassen die internationaal minder van belang of nog niet onderzocht zijn.

- De gedane studie geeft geen inzicht in de bestaande Nederlandse capaciteit voor ecologisch onderzoek aan transgene gewassen, hetgeen uiteraard van groot belang is indien onderzoek de hiaten aan kennis voor goede beoordeling van aanvragen moet opvullen.

Bespreking toepassing Bt-endotoxinen (als transgen en Bt spray)

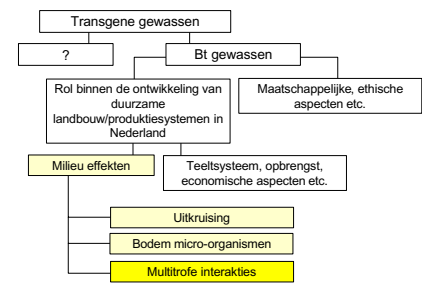
6. Toepassing Bt-endotoxinen:



Bt-gewassen (huidige generatie): 1 transgen construct => één toxine, met expressie in vrijwel de gehele plant (stuifmeel, groene plant delen, wortels)

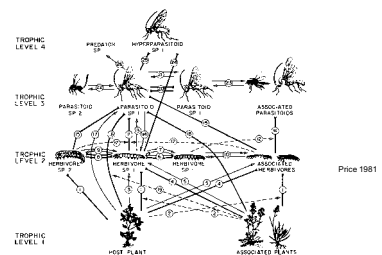
Afbakening enquête – toepassing op multitrofe interacties tussen Bt-gewassen en daarmee gerelateerde organismen.

7. Bt gewassen: Specificiteit van de enquête

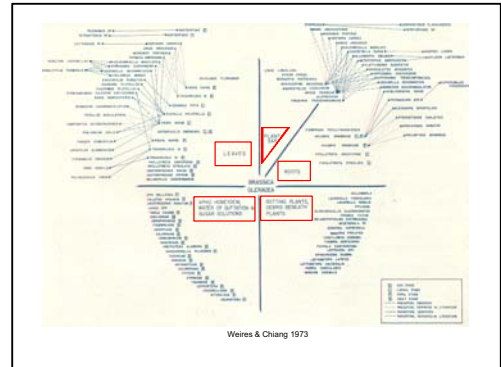


Complexiteit van multitrofe interacties (voorbeeld)

8. Complexiteit van multitrofe interacties:



Idem (voorbeeld)



De vier hoofdthema's uit het rapport van Groot & Dicke (2001)

9. De vier hoofdpunten:

- Hoe verhoudt de toepassing van Bt gewassen zich tot conventionele bestrijdingsmethoden (chemisch zowel als biologische bestrijding, en gewasveredeling) (items 1,13,14)
- Wat zijn de effecten van Bt gewassen op de verschillende trofische niveaus, m.n. non-target organismen (items 2, 5-7, 11)
- De effecten van accumulatie en blootstelling aan toxinen van de verschillende trofische niveaus, zowel onder- als bovengronds (items 4,6,7,9)
- De effecten en gevolgen (plus preventie) van resistentie van plagen tegen Bt toxinen (items 15-22)

Welke kennis is minimaal nodig om gebruik toe te staan en tegelijkertijd het eventueel optreden van ongewenste ecologische neveneffecten te minimaliseren?

Introductie van de 4 vragen van de huidige studie.

10. De vragenlijst

Welke kennis is minimaal nodig om gebruik toe te staan en tegelijkertijd het eventueel optreden van ongewenste ecologische neveneffecten te minimaliseren?

- Welke kennis is gewenst tav Bt gewassen?
- Welke kennis is van cruciaal belang inzake risikobeoordeling?

• Welk systeem?



Welke methoden?



- Tov wat?
- Representatief?
- Multitrofie?
- Complexiteit?

Introductie van het 'ideale' onderzoekssysteem.

11. Het 'ideale' systeem



- ✓ Nederlandse land- of tuinbouw
- ✓ Bt gemodificeerd
- ✓ Multitrofie isogene variant 'bekend'
- ✓ Multitrofie voldoende complex



- ✓ Laboratorium
- ✓ Kas
- ✓ Veld
- ✓ Organismaal
- ✓ Populatie

✓ event 1 ✓ event 2 ✓ event 3

✓ Geschikt voor studies naar uitkruising en bodem ecosysteem

12. Vragen:

DEEL 1

1a Gezien de gedane studies naar de effecten van Bt gewassen op de ecologie van zowel plaaginsekten als non-target insekten en hun predatoren/parasieten, waar zitten de belangrijkste leemtes in onze kennis?

12. Vragen (vervolg):

DEEL 1

1b. Welke van deze leemtes zijn het belangrijkste als het gaat om het inschatten van de risico's van transgene gewassen m.b.t. multitrofe interacties?

Deel 1 (Vraag 1a en 1b), visies en opvattingen omtrent de algemene en specifieke hiaten in de kennis omtrent de invloed van Bt-gewassen op multitrofe interacties.

12. Vragen (vervolg):

DEEL 2

2a. Welk multitroof systeem zou gekozen moeten worden om een zo duidelijk mogelijk inzicht te verwerven in de ecologische effecten van Bt gewassen?

- ✓ Bt gemodificeerd
- ✓ Multitrofe isogene variant 'bekend'
- ✓ Multitrofe voldoende complex
- ✓ Meerdere Bt cultivars
- ✓ Laboratorium
- ✓ Organismaal
- ✓ Kas
- ✓ Populatie
- ✓ Veld
- ✓ Geschikt voor studies naar uitkruising en bodem ecosysteem

12. Vragen (vervolg):

DEEL 2

2b. Voldoet dit model aan multitrofe, dwz zijn er interacties tussen zowel target als non-target herbivoren en parasieten/predatoren, zijn bestuivende insekten van belang, en kunnen effecten op bodem arthropoden worden bestudeerd?

2c. Welke interacties tussen trofische niveau's verdienen speciale aandacht, en welke kunnen het beste bijdragen aan het inschatten van de ecologische effecten van Bt gewassen?

2d. Hoe reduktionistisch van aard mag het model zijn om inzicht in de volledige complexiteit van het multitrofisch systeem niet te verwaarlozen?

Deel 2 (Vraag 2a t/m 2d), identificatie van mogelijke onderzoekssystemen, definitie van multitrofe, en inzicht in complexiteit van het systeem.

12. Vragen (vervolg):

DEEL 3

3a. Hoe kenmerkend zijn de reeds uitgevoerde studies voor de Nederlandse landbouw? Zijn er onderzoeksaspecten specifiek van belang voor Bt gewassen en hun toelating in Nederland?

3b. Wat is het referentiekader? M.a.w. waarmee vergelijk je het modelsysteem? Met gangbare landbouwtechnieken, met geïntegreerde bestrijding of met biologische landbouw?

3c. Hoe evalueer je het belang van het gemeten effect?

3d. Welke algemene danwel specifieke onderzoekstechnieken zijn nodig om deze leemtes op te vullen?

12. Vragen (vervolg):

DEEL 4

4a. Welk systeem wordt nu bestudeerd in uw onderzoeksgroep? Kan dit systeem bijdragen aan de opheldering van ecologische vraagstukken mbt Bt gewassen? Zo ja, op wat voor manier?

4b. Is de groep bereid om specifiek onderzoek te verrichten aan multitrofe interacties tav Bt gewassen (onder voorwaarde dat financieringsmogelijkheden beschikbaar komen via een NWO programma)? Zo ja, waar zou de groep specifiek aandacht aan willen besteden (en waarom is dat belangrijk)?

4c. Zijn er nog andere aspecten die U van belang acht die hier niet zijn besproken?

Deel 3 & 4 (Vraag 3a t/m 3d; Vraag 4a t/m 4c), plaatsing van onderwerp in Nederlandse context, definitie van referentiekader en benodigde technieken. Aanwezigheid van expertise voor het bestuderen van multitrofe interacties in Bt-gewassen, en interesse in een landelijk onderzoeksprogramma.