



**Helse- og miljørisikovurdering genmodifisert
maishybrid Bt11 x MIR604 x GA21 fra Syngenta
Seeds Inc.**

(EFSA/GMO/UK/2008/56)

**Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer i
Vitenskapskomiteen for mattrygghet**

19.11.08

BIDRAGSYTERE

Den som utfører arbeid for VKM, enten som oppnevnte medlemmer eller på *ad hoc*-basis, gjør dette i kraft av sin egen vitenskapelige kompetanse og ikke som representanter for den institusjon han/hun arbeider ved. Forvaltningslovens habilitetsregler gjelder for alt arbeid i VKM-regi.

VURDERT AV

Faggruppe for genmodifiserte organismer:

Knut Berdal (leder), Thomas Bøhn, Askild Holck, Helge Klungland, Casper Linnestad, Richard Meadow, Anne I. Myhr, Audun Nerland, Ingolf Nes, Kåre M. Nielsen, Hilde-Gunn Opsahl Sorteberg, Odd E. Stabbetorp, Rose Vikse

Koordinatorer fra sekretariatet:

Arne Mikalsen og Merethe Aasmo Finne

SAMMENDRAG

Helse- og miljøvurderingen av den genmodifiserte herbicid- og insektsresistente maishybriden Bt11 x MIR604 x GA21(EFSA/GMO/UK/2008/56) fra Syngenta Seeds Inc. er utført av Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet. Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning (DN) ber Vitenskapskomiteen for mattrygghet om å vurdere den genmodifiserte maishybriden Bt11 x MIR604 x GA21 til bruk i næringsmidler og fôrvarer, men ikke for dyrking.

Vurderingen av den genmodifiserte maisen er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSAAs nettside GMO EFSAAnet. I tillegg er det benyttet informasjon fra andre vitenskapelige publikasjoner i vurderingen. Bt11 x MIR604 x GA21 er risikovurdert i henhold til tiltenkt bruk i EU/EØS-området, og faggruppen har derfor ikke vurdert mulige helse- og miljøeffekter knyttet til dyrking av maislinjen. Vurderingen er i overensstemmelse med miljø- og helsekravene i genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven, samt EU-forordning 1829/2003/EF og utsetningsdirektiv 2001/18/EF med annekser. Det presiseres at de deler av den norske konsekvensutredningsforskriften som vedrører bærekraft, samfunnsnytte og etikk ikke er vurdert av VKM. Videre er prinsippene i EFSAAs retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter (EFSA 2006) og Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) konsensusdokument for mais (OECD 2002) lagt til grunn for vurderingen.

Den vitenskapelige vurderingen omfatter benyttet transformeringsprosess, vektorer, karakterisering og nedarving av genkonstruksjonen, det transgene konstrukt, komparativ analyse av ernæringsmessig kvalitet, mineraler, vitaminer, fettsyresammensetning, antinæringsstoffer, aminosyrer, kritiske toksiner, allergener og nye proteiner. Videre er agronomiske egenskaper, potensiale for utilsiktede effekter på fitness, genoverføring og effekter på ikke-målorganismer vurdert.

Maishybriden Bt11 x MIR604 x GA21 er resultat av konvensjonell kryssing mellom foreldrelinjene Bt11, GA21 og MIR604. Foreldrelinjen Bt11 har fått innsatt de bakterielle genene *cry1Ab* og *pat*, fra henholdsvis *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* og *Streptomyces viridochromogenes* strain Tu494. *Cry1Ab*-genet koder for et δ -endotoksin som gir plantene toleranse mot enkelte arter i ordenen *Lepidoptera*. *Pat*-genet koder for enzymet phosphinothricin acetyl transferase (PAT), som acetylerer og inaktiverer glufosinat-ammonium, virkestoffet i fosfinothricin-herbicer (Finale mfl). Foreldrelinjen MIR604 har fått innsatt et modifisert *cry3A*-gen (*mcry3A*) fra *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* og genet *pmi* fra *E. coli*. *mcry3A* genet uttrykker δ -endotoksinet mCry3A, som gir plantene toleranse mot angrep fra bladbiller i slekten *Diabrotica*. *Pmi* genet uttrykker enzymet fosfomannose isomerase, som gir toleranse overfor sukkerarten mannose. Foreldrelinjen GA21 uttrykker mEPSPS-proteiner, som er resultat av introduksjon av genet *mepsps* fra mais (*Zea mays*). *Mepsps*-genet er resultatet av *in vitro*-mutagenese av mais-*epsps* genet. *Mepsps*-genet koder for enzymet 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfatsyntetase, som omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfat, en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. N-fosfonometylglycin (glyfosat) hemmer generelt EPSPS-enzymet og blokkerer derved biosyntesen av aromatiske aminosyrer i planter. mEPSPS enzymet skiller seg fra villtype mais EPSPS-enzym ved at 3 av totalt 445 aminosyrer er endret. I motsetning til umodifisert EPSPS-enzym i mais er det modifiserte mEPSPS-enzymet også aktivt ved nærvær av glyfosat. Maislinjen Bt11 x MIR604 x GA21 inneholder ingen markørgener for antibiotikaresistens. Foreldrelinjene er tidligere vurdert av VKMs Faggruppe for genmodifiserte organismer (VKM 2005a, 2006, 2007).

Analysene av ernæringsmessige viktige komponenter ble vurdert. Det er påvist statistisk signifikante forskjeller for enkelte komponenter, men forskjellene er ikke konsistente over forsøksfelt og ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen. Faggruppen anser det for lite trolig at disse forskjellene har noen helsemessig konsekvens, og konkluderer med at det ikke er grunn til å anta at den ernæringsmessige kvaliteten til den genmodifiserte maisen Bt11 x MIR604 x GA21 er forskjellig fra umodifisert mais.

Flere studier viser at proteinene PAT, PMI, mEPSPS, Cry1Ab og mCry3A ikke er akutt toksiske. Faggruppen konkluderer med at det er lite sannsynlig at eksponering for disse proteinene i seg selv og i de mengder som tilføres via genmodifisert mais kan medføre akutte forgiftninger.

Ingen av proteinene som blir uttrykt som følge av genmodifiseringen har likheter med kjente allergener eller egenskaper som tilsier at de er allergener. Det er imidlertid ikke vurdert om de uttrykte toksinene Cry1Ab og mCry3A kan ha adjuvanseffekt, d.v.s. fremming av immunreaksjon mot andre stoffer.

Et flertall av medlemmene i Faggruppe for genmodifiserte organismer finner det ikke sannsynliggjort at Cry1Ab og mCry3A har egenskaper som fører til hemming av den toleransen som fordøyelsessystemets slimhinner har mot proteiner (adjuvanseffekt). På bakgrunn av at Cry1Ab- og mCry3A-proteinene brytes ned i magesaft og at maten for øvrig inneholder en lang rekke stoffer som virker som adjuvanter, vurderes adjuvansproblemstillingen i forbindelse med Bt11 x MIR604 x GA21 mais til å være neglisjerbar.

Et mindretall av faggruppen (A.H. Nerland, T. Bøhn, A.I. Myhr, C. Linnestad, H. Klungland) finner det vanskelig å vurdere om næringsmidler og fôrvarer fra maisen Bt11 x MIR604 x GA21 er mer allergifremkallende enn næringsmidler og fôrvarer fra umodifiserte maiskorn. På bakgrunn av foreliggende eksperimentelle studier i mus, som viser at Cry-proteinene kan hemme den toleransen som fordøyelsessystemets slimhinner har mot proteiner, finner imidlertid medlemmene at muligheten for økt allergifremkallende aktivitet Bt11 x MIR604 x GA21 ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes. Mindretallet i faggruppen mener derfor at det må kreves av Syngenta å kommentere forsøkene som viser adjuvanseffekt av det beslektede Cry1Ac.

Søknaden gjelder godkjenning av maishybriden Bt11 x MIR604 x GA21 for import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige helse- og miljøeffekter knyttet til dyrking av maishybriden. Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av maishybriden i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Risiko for utkryssing med dyrkede sorter vurderes til å være ubetydelig. Ved foreskrevne bruk av maishybriden Bt11 x MIR604 x GA21 antas det ikke å være risiko for negative effekter på målorganismer, ikke-målorganismer eller på abiotisk miljø i Norge.

Samlet vurdering

Flertallet av medlemmene i Faggruppe for genmodifiserte organismer finner at det er lite trolig at bruk av maishybriden Bt11 x MIR604 x GA21 vil medføre endret risiko for helse og miljø i forhold til annen mais.

Et mindretall av faggruppen (A.H. Nerland, T. Bøhn, A.I. Myhr, C. Linnestad, H. Klungland) mener at dersom en ser bort fra adjuvansproblematikken, er det lite trolig at bruk av maishybriden Bt11 x MIR604 x GA21 vil medføre endret risiko for helse og miljø i forhold til annen mais. Medlemmene finner imidlertid at muligheten for økt allergifremkallende aktivitet hos Bt11 x MIR604 x GA21 ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes.

En samlet faggruppe påpeker kunnskapshull knyttet til adjuvans generelt og om Cry-proteinene i Bt11 x MIR604 x GA21 kan virke som adjuvant.

NØKKELORD

Mais, *Zea mays* L., genmodifiserte hybrid Bt11 x MIR604 x GA21, EFSA/GMO/UK/2008/56, herbicidtoleranse, mEPSPS, PAT, glyfosat, glufosinat ammonium, insektsresistens, mCry3A, Cry1Ab, mannosetoleranse, PMI, helsemessig trygghet, helse, miljørisiko, forordning 1829/2003/EF, direktiv 2001/18/EF

FORKORTELSER/ORDFORKLARINGER

ADF	Acid detergent fiber, fiberfraksjon av ufordøyelig plantemateriale i fôr, vanligvis cellulosefiber dekket med lignin og silikat. Plantematerialet fordøyes med en syre-detergentløsning (ADF). Ufordøyd masse betegnes som ADF. Fôr med lavt ADF-innhold er mer fordøyelig og har større energiinnhold.
Allel	Et bestemt gen kan foreligge i ulike varianter (alleler). Allelene kan være dominante (bestemmende for fenotypen) eller recessive (vikende).
ARMG	Antibiotikaresistensmarkørgen
Backcross (BC)	Tilbakekryssing. Kryssing mellom en hybridlinje (avkom fra to genetisk ulike foreldre) og en av foreldrelinjene, alternativt en genetisk ekvivalent organisme. Strategi i planteforedling for å overføre primært kvalitative karakterer, for eksempel sjukdomsresistens, til elitelinjer av både kryssbefruktede og selvpollinerte arter. Gjentatte tilbakekryssinger reduserer det genetiske bidraget, som uønskede alleler fra den andre donorplanten.
BLASTn	BC ₁ , BC ₂ etc: betegnelse på 1. og 2. tilbakekryssingsgenerasjon, etc.
BLASTP	algoritme som benyttes for homologisammenligning av nukleotidsekvenser.
BLASTx	algoritme som benyttes for homologisammenligning av aminosyresekvenser i proteiner.
bp	algoritme som benyttes for oversetting fra kodende nukleotidsekvenser til aminosyresekvenser.
<i>B.t.</i>	Basepar
Codex	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Cry	FAO/WHO-organ som etablerer globale handelsstandarder for mat.
Cry1Ab	Krystallproteiner fra jordbakterien <i>Bacillus thuringiensis</i> .
DN	δ-endotoksin isolert fra jordbakterien <i>Bacillus thuringiensis</i> subspecies <i>kurstaki</i> , toksinet dreper insektslarver fra arter i ordenen <i>Lepidoptera</i> .
DNA	Direktoratet for naturforvaltning
Dominant allel	Deoxyribonukleinsyre (DNA)
EFSA	Et allel som uttrykker same fenotype, uavhengig av om allelene i genparet er like (homozygot) eller ulike (heterozygote).
ELISA	European Food Safety Authority
EMBL	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPSPS	European Molecular Biology Laboratory, det europeiske forskingssenteret for molekylærbiologi.
FAO	5-enolpyruvylsukinat-3-fosfat syntetase
FIFRA	Food and Agriculture Organization, FN's organisasjon for ernæring og landbruk.
Fitness	US EPA Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act. USAs føderale lov om insektdrepende midler, soppdrepende midler og midler mot skadedyr.
GenBank	Et individs relative evne til å føre sine gener/alleler videre til kommende generasjoner
GLP	database som inneholder nukleotidsekvenser, se NCBI. Per januar 2009 inneholder databasen mer enn 61 millioner sekvenser.
Glufosinat	Good Laboratory Practices, retningslinjer for godt laboratoriearbeid.
ammonium (GA)	Bredspektret herbicid
Glyfosat	Bredspektret herbicid
GMO	Genmodifisert organisme
GMP	Genmodifisert plante
Herbicid	Ugrasmiddel
Intron	Ikke-kodende områder i et eukaryot gen.
Locus	Spesifikk posisjon på kromosomet der et gen er lokalisert.
MALDITOF	Massespektrometrimetode for å måle molekylvekt til peptider.
Mannose	Monosakkarid

mCry3A	Modifisert Cry3A-toksin fra bakterien <i>Bacillus thuringiensis</i> subspecies <i>tenebrionis</i> . Toksinet dreper larver fra bladbiller i slekten <i>Diabrotica</i> .
Mendelsk nedarving	Lovmessig nedarvingsmønster ved ulike typer kryssinger.
mRNA	Budbringer-RNA , budstikke-RNA, messenger-RNA . RNA som spesifiserer rekkefølgen av aminosyrer under proteinsyntesen.
MT	Mattilsynet
NCBI	National Center for Biotechnology Information (NCBI) er en del av USAs National Library of Medicine (NLM), som er en gren av National Institutes of Health (NIH). NCBIs database huser genomsekvensdata i GenBank.
NDF	Neutral detergent fiber, dvs. fiberfraksjon som inneholder hemicellulose og ADF.
Northern blot	Teknikk for overføring av RNA til en membran for videre studier av overførte RNA-sekvenser.
Nucosulfuron	Smalspektret herbicid, hemmer ALS enzymer.
Nær-isogen linje	Linjer eller sorter som er genetisk identiske, med unntak av ett locus eller kromosomsegment.
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
ORF	Open Reading Frame (åpen leseramme)
PAT	Proteinet phosphinotricin acetyl transferase(PAT), acetylerer og inaktiverer glufosinat.
PCR	Polymerase chain reaction. Polymerase kjedereaksjon. Metode for å lage mange kopier av en DNA-sekvens vha primere.
PDB	Protein Data Bank, database som inneholder eksperimentelt bestemte 3-dimensjonale strukturer av proteiner og nukleotider.
Promoter	En molekylærbiologisk promoter inneholder DNA-sekvenser som binder enzymet RNA polymerase. RNA polymerase fører til syntese av mRNA fra DNA, dvs. omskriving(transkribering) av DNA til mRNA.
Rekombinant DNA	kombinasjon av DNA sekvenser som normalt ikke opptrer sammen, dvs. DNA-fragmenter(gen, promoter, terminator etc.) fra flere forskjellige kilder (f.eks. bakterier, planter) som skjøtes sammen.
RNA	Ribonukleinsyre
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat (SDS)-polyakrylamidelektroforese. Elektroforetisk metode for separasjon av proteiner.
Southern blot	Teknikk for overføring av DNA til en membran for videre studier av overførte DNA-sekvenser.
T-DNA	DNA fra Ti-plasmidet i jordbakterien <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Ti-plasmidets T-DNA (Transfer-DNA), overføres fra bakterien og settes inn i plantecellers kjernegenom. T-DNAet som overføres avgrenses av V (venstre) og H (høyre) flankesequenser, og begrenser derfor delen av Ti-plasmidet som overføres og gjør at resten av vektoren ikke blir satt inn på plantekromosomene.
Terminator	En molekylærbiologisk terminator er en DNA-sekvens som fører til at RNA-polymerasen stopper opp, og avslutter transkripsjonen.
U.S. EPA	United States Environmental Protection Agency, USAs miljøvernmyndigheter.
Utviklingsstadier hos mais:	
	<u>Vegetative stadier</u>
	VE: oppspiring
	V1: 1. blad
	V2: 2. blad
	V(n): n'te blad
	VT: synlige hannblomsterstand (tassel)
	<u>Reproduktive stadier</u>
	R1: synlige hunnblomster
	R2: 'blister'
	R3: melkmodning
	R4: deigmodning
	R5: dent

	R6: fysiologisk moden
Vektor	en molekylærbiologisk vektor (kloningsvektor) er et kunstig fremstilt DNA-molekyl som benyttes for å overføre genetisk materiale til en celle. De fire hovedtypene av vektorer er plasmider, bakteriofager og andre virus, kosmider og kunstige kromosomer.
Western-blot	Metode for overføring av proteiner til en membran, som letter videre studier.
WHO	World Health Organisation. Verdens helseorganisasjon, organ under FN.

INNHOLDSFORTEGNELSE

BIDRAGSYTERE.....	2
Vurdert av	2
SAMMENDRAG.....	3
NØKKEWORD	4
FORKORTELSER/ORDFORKLARINGER	5
INNHOLDSFORTEGNELSE	8
BAKGRUNN.....	9
OPPDRAK FRA DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING OG MATTILSYNET	9
RISIKOVURDERING	11
1. Innledning	11
1.1 Beskrivelse av egenskaper(er) og virkningsmekanismer	11
2. Molekylær karakterisering	12
2.1. Hybridproduksjon	12
2.2. Evaluering av foreldrelinjer	12
3. Komparative analyser	20
3.1. Valg av komparator og forsøksdesign	20
3.2. Analyser av ernæringsmessige komponenter.....	21
3.3. Agonomiske egenskaper.....	22
3.4. Delkonklusjon	22
4. Dokumentasjon av toksisitet og allergenisitet.....	22
4.1. Toksisitet.....	22
4.2. Allergenisitet.....	23
4.3. Delkonklusjon	24
5. Miljørisikovurdering	25
5.1. Potensiale for utilsiktede effekter på fitness relatert til genmodifiseringen.....	25
5.2. Potensiale for genoverføring.....	25
5.3. Potensiale for samspill mellom GMP og målorganismer	26
5.4. Potensiale for samspill mellom GMP og ikke-målorganismer	27
5.5. Potensiale for samspill med abiotisk miljø og eventuelle effekter på bio-geokjemiske prosesser	27
5.6. Overvåking.....	27
5.7. Delkonklusjon	28
6. Vurdering av søkers dokumentasjon.....	28
KONKLUSJON.....	29
REFERANSER	30

BAKGRUNN

Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet er bedt av Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning om å foreta en vurdering av helse- og miljørisiko ved en eventuell godkjenning av den genmodifiserte maishybriden Bt11 x MIR604 x GA21 (EFSA/GMO/UK/2008/56) fra Syngenta Seeds Inc. Bt11 x MIR604 x GA21 er søkt omsatt i EU/EØS-området under forordning (EF) Nr. 1829/2003 om genmodifiserte næringsmidler og fôrvarer (artiklene 5,17,3(1c) og 15(1c), og i overensstemmelse med direktiv 2001/18/EF, del C. Søknaden omfatter bruksområdene import, prosessering, næringsmidler og fôrvarer, men ikke dyrking. Søknaden ble fremmet og anbefalt av britiske myndigheter i mai 2008, og lagt ut på EFSA-nett 19. august, med frist på 90-dager for innspill fra EU- og EØS/EFTA-landene. Norge har ikke tidligere uttalt seg om maishybriden.

Foreldrelinjene MIR604 og GA21, samt maishybridene MIR604 x GA21 (EFSA/GMO/UK/2007/48), Bt11 x GA21 (EFSA/GMO/UK/2007/49) og Bt11 x MIR604 (EFSA/GMO/UK/2007/50) er tidligere søkt godkjent under forordning 1829/2003/EF til import, prosessering, mat og fôr i EU/EØS-området. Foreldrelinjen Bt11 er godkjent som åkermais under direktiv 90/220/EF, og som søtmais under forordning (EF) nr. 258/97. Linjen ble videre notifisert som eksisterende produkt under forordning 1829/2003/EF, artikkel 8 og 20, til bruk som mat, fôr, samt tilsetningsstoffer til mat og fôr. Godkjenningen av Bt11 gikk ut 18. april 2007, og Syngenta har søkt om fornyet godkjenning fram til 2017. Maislinjen Bt11 er også søkt godkjent for dyrking i EU/EØS-området.

Utenfor EU/EØS-området er Bt11 x MIR604 x GA21 godkjent til bruk som næringsmiddel i Japan (Agbios 2008).

Faggruppe for genmodifiserte organismer har tidligere vurdert foreldrelinjene og hybridene med hensyn på eventuelle helseeffekter ved bruk av maislinjene som mat og fôr (VKM 2005a, 2006, 2007 a,b).

OPPDRAK FRA DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING OG MATTILSYNET

Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning har i brev datert 12.5.2006 (ref. 2006/17817) og 23.4.2008 (ref. 2008/4367 ART-BI-BRH) gitt Vitenskapskomiteen for mattrygghet i oppdrag å foreta løpende risikovurderinger av genmodifiserte næringsmidler og fôrvarer som faller inn under EUs forordning 1829/2003/EF. VKM er bedt om å vurdere helse- og miljøaspekter ved slike produkter, og på bakgrunn av vurderingene gi innspill til EFSA-nett.

Søknad EFSA/GMO/UK/2008/56, genmodifisert maishybrid Bt11 x MIR604 x GA21, ble lagt ut på EFSA-nett 19. august 2008. Faggruppe for genmodifiserte organismer skal i tråd med oppdragsbrev utarbeide helse- og miljørisikovurdering av maishybriden Bt11 x MIR604 x GA21 til import og industriell prosessering, samt til bruk som mat og fôr. Søknaden omfatter ikke dyrking.

Vurderingen av maishybrid Bt11 x MIR604 x GA21 skal utføres i henhold til tiltenkt bruk og i overensstemmelse med prinsippene som er nedfelt i EFSA's retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter ("Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed") (EFSA 2006).

I henhold til oppdragsbrev fra DN skal VKM primært fokusere på miljørisiko i EØS-området, og på miljørisiko som er spesifikke for Norge. Det skal også gis en samlet konklusjon om miljørisiko i tråd med kravene i forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven, vedlegg 2 C.

Produktet som ønskes vurdert:

Genmodifisert mais, hybrid Bt11 x MIR604 x GA21 fra Syngenta Company

Unik kode: SYN-BTØ11-1 x SYN-IR6Ø4-5 x MON-ØØØ21-9.

Notifikasjonsnummer i EU:

Status i EU: Søknaden er lagt ut på EFSA-net med frist 19. november for innspill og kommentarer fra medlemslandene.

Ønsket svarfrist til MT og DN: 16. november 2008.

RISIKOVURDERING

1. Innledning

Helse- og miljørisikovurderingen av maishybriden Bt11 x MIR604 x GA21 er i hovedsak basert på dokumentasjon som er tilgjengelig på EFSAAs nettside GMO EFSA-net, samt uavhengige vitenskapelige publikasjoner med referee. I henhold til Syngenta er bruksområder for søknaden import og bruk som næringsmidler, fôrvarer og industrielle produkter, ikke for dyrking. Primærbruken av maiskorn i Norge i dag er til dyrefôr, men mais brukes også til industriell produksjon av etanol, maismel, popkorn, raffinert stivelse og søtningsprodukter. Risikovurderingen er gjort i henhold til tiltenkt bruk, og i overensstemmelse med miljø- og helsekravene i genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven. Videre er kravene i EUs forordning 1829/2003/EF og direktiv 2001/18/EF med annekser lagt til grunn for vurderingen.

I tråd med VKMs mandat presiseres det at vurderinger av etikk, bærekraft og samfunnsnytte i henhold til kravene i genteknologiloven og dens konsekvensutredningsforskrift ikke skal utføres av Faggruppe for genmodifiserte organismer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige helse- og miljøeffekter ved dyrking og prosessering utenfor EU/EØS-området.

Faggruppen har vedtatt å benytte EFSAAs retningslinjer som gruppens retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter. Prinsippene som er lagt til grunn for vurderingen, er derfor hentet fra EFSAAs dokument "Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed" (EFSA 2006). Ved vurdering av vesentlig likhet har faggruppen lagt vekt på OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002), som gir anbefalinger over hvilke parametere som bør undersøkes.

Det er kun medlemmene i Faggruppe for GMO som har vurdert den genmodifiserte maisen.

1.1 Beskrivelse av egenskaper(er) og virkningsmekanismer

Maishybriden Bt11 x MIR604 x GA21 er resultat av konvensjonell kryssing mellom foreldrelinjene Bt11, GA21 og MIR604.

Foreldrelinjen Bt11 har fått innsatt de bakterielle genene *cry1Ab* og *pat*, isolert henholdsvis fra *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* og *Streptomyces viridochromogenes* strain Tu494. *Cry1Ab*-genet koder for δ -endotoksiner som gir plantene toleranse mot enkelte arter i ordenen *Lepidoptera*, eksempelvis *Ostrinia nubilalis* (maispnylende) og arter i slekten *Sesamia* (nattflyfamilien, *Noctuidae*). Genuttrykket reguleres av en 35S promotor fra blomkålmosaikkvirus (CaMV), mens en IVS6-intronsekvens fra maisgenet *Adh1-S* øker transkripsjonsnivået og økt konsentrasjon av *Cry1Ab*-toksinet i planten. *Pat*-genet koder for enzymet phosphinothricin acetyl transferase (PAT), som acetylerer og inaktiverer glufosinat-ammonium, virkestoffet i fosfotricin-herbicerer (Finale mfl). Genuttrykket reguleres av tilsvarende 35S CaMV-promotor som *cry1Ab*, og IVS 2 intronsekvens.

Foreldrelinjen MIR604 er transformert med et modifisert *cry3A*-gen (*mcry3A*) fra *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, under kontroll av en maispromotor fra et metallothionein-lignende gen (*mtl*). *mcry3A*-genet uttrykker et *mcry3A*-protein, og gir plantene toleranse mot angrep fra bladbiller i slekten *Diabrotica*, eksempelvis *D. virgifera virgifera* ('Western Corn Rootworm) og *D. longicornis barberi* ('Northern Corn Rootworm'). Proteinene uttrykkes primært i røttene hos maisplantene. I tillegg inneholder den innsatte genkonstruksjonen et *pmi*-gen fra *Escherichia coli*. Genet koder for enzymet fosfomannose isomerase (PMI), som omdanner mannose-6-fosfat til fruktose-6-fosfat. Mannose kan derfor benyttes som karbonkilde hos planter som uttrykker *pmi*-genet, og er i denne sammenheng brukt som seleksjonsmarkør under transformasjonsprosessen. *Pmi*-genet [1]

er under kontroll av maispromotoren *ZmUbiIntron*, som uttrykkes konstitutivt i enfrøbladete planter.

Foreldrelinjen GA21 er fremkommet ved introduksjon av et modifisert *5-enolpyruvylsikumat-3-fosfatsyntetasen (mepsps)* gen fra mais (*Zea mays*). Genet *mepsps* uttrykker enzymet 5-enolpyruvylsikumat-3-fosfatsyntetasen (mEPSPS), som omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikumat-3-fosfat, viktige metabolitter i syntesen av aromatiske aminosyrer. N-fosfonometylglycin (glyfosat) hemmer generelt EPSPS-enzymet og blokkerer derved biosyntesen av aromatiske aminosyrer i planter. mEPSPS proteinet skiller seg fra EPSPS proteinet fra villtype-mais ved at 3 av totalt 445 aminosyrer er endret i mEPSPS proteinet. I motsetning til umodifisert EPSPS i mais er mEPSPS-enzymet også aktivt ved nærvær av glyfosat.

2. Molekylær karakterisering

2.1. Hybridproduksjon

Hybridforedling er den dominerende foredlingsstrategien i konvensjonell foredling og sortsutvikling i mais i dag. Metodikken innebærer utvikling av innavlede, tilnærmet homozygote foreldrelinjer, som så krysses for produksjon av F1-hybridfrø. Dette gir ensartede og produktive sorter (heterosiseffekt). Den transgene hybriden Bt11 x MIR604 x GA21 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom maislinjene Bt11, MIR604 og GA21.

2.2. Evaluering av foreldrelinjer

2.2.1 Maislinje Bt11

Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

Hybriden Bt11 åkermais er fremkommet ved at det genetiske konstruktet ble ført inn i protoplaster fra den innavlede maislinjen H8540 ved hjelp av polyetylen glykol og MgCl₂. Maisprotoplasten er transformert med et rekombinant DNA-fragment som er klippet ut av plasmidet pZO1502 med restriksjonsenzymet NotI.

Selv om plasmidet pZO1502 inneholder gener som koder for ampicillinresistens (*ampR* gen) som brukes til seleksjon av plasmidet i *E. coli*, er ikke dette genet til stede i Bt11-transformanter. Maistransformanten Bt11 inneholder genet *cryIAb* som koder for Cry1Ab proteinet, som gir insektresistens og genet *pat* som gir glufosinattoleranse.

Beskrivelse av de innsatte genene

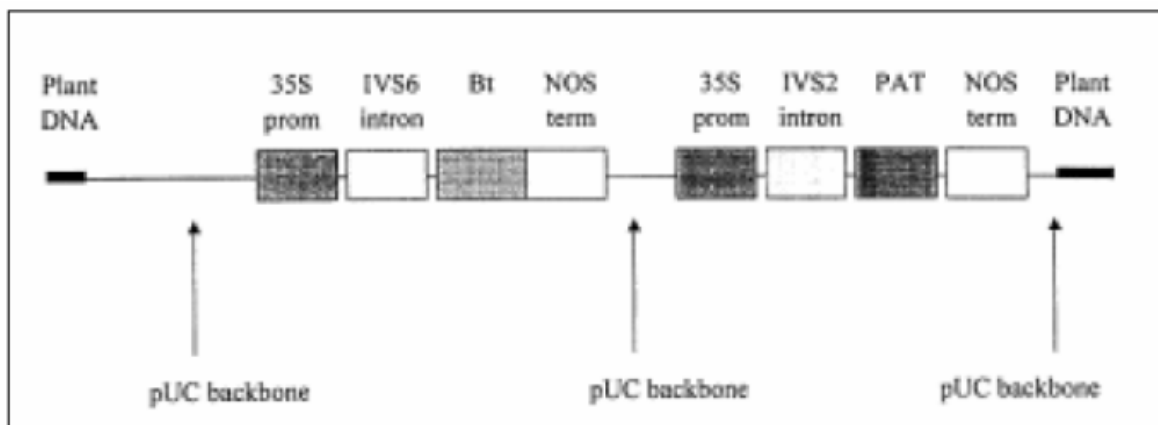
Southern blot og PCR har blitt brukt for å karakterisere det rekombinante DNA-fragmentet i planten. Molekylærbiologisk karakterisering viser at det er satt inn bare en kopi av det rekombinante DNA-fragmentet i maisens genom. Dette fragmentet inneholder følgende gener og DNA-elementer (se figur 1):

CryIAb-ekspresjonskasset

- | | | |
|----|---------------|--|
| a) | <i>35S</i> | Blomkålmosaikkvirus (CaMV) promoter, 514 basepar (bp) |
| b) | <i>IVS6</i> | Intron fra mais <i>Adh1-S</i> gen (alkohol dehydrogenase 1S), 472 bp |
| c) | <i>CryIAb</i> | en syntetisk, modifisert versjon av <i>cryIAb</i> -genet, 1845 bp. Koder for Cry1Ab-protein |
| d) | <i>NOS-3'</i> | Et 3'-område til nopalinsyntetase gen som ikke blir translateret, men som terminerer transkript og som dirigerer polyadenylering, 270 bp |

Pat-ekspresjonskasset

- a) 35S Blomkålmosaikvirus (CaMV) promoter for *pat* genet, 551 bp
- b) IVS2 Intron fra mais *Adh1-S* genet (alkohol dehydrogenase 1S), 178 bp
- c) *pat* glufosinattoleransegenet, modifisert for å optimalisere ekspresjon i planter, 558 bp
- d) *NOS-3'* Et 3'-område til nopalinsyntetase genet som ikke blir translaterert, men som terminerer transkript og som dirigerer polyadenylering, 220 bp
- e) *ori/pUC18* Replikasjonsorigo som dirigerer replikasjonen av plasmidet i *E. coli*, inneholder deler av *lacZ* og *laci* gener og et segment på 1079 bp som inneholder ori genet, som dirigerer replikasjonen i bakterier, 1400 bp



Figur 1. Rekombinant T-DNA I fragment i maisens genom.

Karakterisering av geninnsettingen

Den genmodifiserte maislinjen Bt11 uttrykker insektsresistens og herbicidtoleranse.

Bakgrunnen for insektsresistensen er at planten uttrykker bakterieproteinene Cry1Ab. Cry1Ab-proteinene er et toksin som gir planten toleranse mot larver i sommerfuglordenen *Lepidoptera*. Basesekvensen til *cry1Ab*-genet stammer fra jordbakterien *Bacillus thuringiensis*. Bakgrunnen for glufosinattoleransen er *pat*-genet, som stammer fra jordbakterien *Streptomyces viridochromogenes*. *Pat*-genet uttrykker enzymet fosfotricin acetyltransferase (PAT, phosphinotricin acetyl transferase) som har høy spesifisitet overfor fosfotricin (glufosinat), som er den aktive komponenten i herbicider av glufosinat-typen. PAT inaktiverer fosfotricin ved N-acetylering og beskytter derved planten i et fosfotricinmiljø. Basesekvensene i genet er endret slik at genet kan uttrykkes i planter. PAT proteinets aminosyre-sekvens i planten er lik bakterieproteinets aminosyresekvens.

Molekylærbiologiske analyser

Molekylærbiologiske analyser viser at det rekombinante fragmentet i planten inneholder de samme gener og genelementer som er på det tilsvarende T-DNA fragmentet i plasmidet pZO1502. Cry1Ab- og PAT proteinene som uttrykkes i maiskorn er undersøkt med Western-blot analyse og densitometri, SDS-PAGE og densitometri, trypsinbehandling av proteinene og peptidkartlegging med SDS-PAGE, CNBR-behandling og Southern blot, aminosyreanalyse av N-enden til proteinene, samt glykosyleringsanalyse.

Cry1Ab-proteinene er undersøkt med hensyn til bioaktivitet. Bioaktivitets-assayene (mortalitet og veksthemming) viser ved forsøk med maisspyralide at semidødelig(mortalitet) dose (LD₅₀) for rensede planteproduerte Cry1Ab- og *E. coli* produsert Cry1Ab-protein er henholdsvis 0,47 µg Cry1Ab/ml (variasjonsbredde 0,33 til 0,66 µg Cry1Ab/ml) og 0,50 µg Cry1Ab/ml (variasjonsbredde 0,38 til 1,3

0,66 µg Cry1Ab/ml). Proteinene viser veksthemmende aktivitet (EC₅₀) ved en dose på henholdsvis 0,060 µg Cry1Ab/ml (variasjonsbredde 0,046 til 0,076 µg Cry1Ab/ml) og 0,067 µg Cry1Ab/ml (variasjonsbredde 0,042 til 0,107 µg Cry1Ab/ml).

Det ble ikke påvist glykoliserings seter på proteinene.

PCR-analyser av det rekombinante DNA fragmentet i Bt11 viser at flankesekvensene til fragmentet er genomisk DNA fra mais. Flankerende sekvenser til dette rekombinante DNA-fragmentet er sekvensert, ca. 350 bp oppstrøms (5'-enden til genet) og ca. 540 bp nedstrøms (3'-enden til genet). Det ble påvist homologi hovedsakelig til mais "knob"-assosiert tandem repeat. Sekvensanalyser viser at *amp* genet ikke er satt inn eller limt til det rekombinante fragmentet. Det er påvist vektorsekvenser oppstrøms fra *Bt*-kassetten, mellom de to kassetene, og nedstrøms for *pat* kassetten, se figur 1. Det rekombinante fragmentet er lokalisert på den korte armen til maiskromosom 8.

Informasjon vedr. uttrykk av introduserte gener og åpne leserammer (ORF)

Uttrykk av Cry1Ab- og PAT-protein ble målt i prøver fra ulike plantevev på to utviklingsstadier. Prøvene som er analyserte stammer fra et feltforsøk utført på Syngentas forsøksstasjon i USA i 2006. Forsøksfeltet bestod av et fullstendig randomisert blokkdesign med fem gjentak. Det ble tatt ut to + to prøver av maisplantene fra hver blokk. Detaljer av disse analysene betraktes av Syngenta som konfidensiell informasjon. Prøvene ble tatt av planter fra en hybridlinje og en innavlet linje avledet av Bt11.

Nivået av Cry1Ab i pollen var lavere enn påvisningsgrensen på 0,5 µg/g tørrvekt. Gjennomsnittlig mengde Cry1Ab ble målt til 32,5 µg/g tørrvekt i blad (SD=1,7, variasjonsbredde = 26,8 – 40,6), 10,3 µg/g tørrvekt i røtter (SD=0,5, variasjonsbredde = 8,0 - 12,7), 1,4 µg/g tørrvekt i modne korn (SD=0,3 variasjonsbredde = 0,8 – 1,8) og 18,8 µg/g tørrvekt i hel plante (SD=1,5, variasjonsbredde = 13,0 – 21,3).

Det ble ikke påvist PAT-protein i prøver fra pollen og korn. Gjennomsnittlig mengde i blad ble målt til 0,6 µg/g tørrvekt (SD=0, variasjonsbredde = 0,5 – 0,7), mens innholdet av PAT i røtter og hel plante ble målt til henholdsvis 1,0 µg/g tørrvekt (SD=0,1, variasjonsbredde = 0,6 – 1,3) og 0,7 µg/g tørrvekt (SD=0,1, variasjonsbredde = 0,7 – 0,8).

Teoretiske analyser av mulige polypeptider fra hver leseramme ble utført ved å kjøre BLASTN programmet mot 2003 versjonen av databasen NCBI nr. NCBI nr database for 2003 inneholdt alle sekvenser fra GenBank, RefSeq Nucleotides, EMBL, DNA Database of Japan og fra PDB. Det ble ikke påvist likheter til allergener, toksiner og farmakologiske aktive proteiner. Resultatene fra disse teoretiske analysene viser at det er lite sannsynlig at dersom noen av disse leserammene skulle bli transkribert, vil dette resultere i polypeptider som medfører potensielle toksiske eller allergene konsekvenser. Det ble funnet likhet til mais "knob" tandem repeterte sekvenser på 180 bp. "Knob" hører til heterokromatin- klassen. "Knob" sekvenser blir ikke transkribert.

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

Genetisk stabilitet ble evaluert i tilbakekryssingsgenerasjonene BC3 og BC6 i et kryssingsprogram med elitelinjen H854. Stabilitet av den innsatte genkonstruksjonen i Bt11 er vist både ved spaltingsanalyser og Southern blot. Det ble ikke funnet forskjeller i båndmønster mellom de ulike generasjonene, og stabiliteten av innsatt DNA ble vurdert til å være høy.

Undersøkelser som er foretatt på den genmodifiserte planten og de etterfølgende krysninger viser at:

- en kopi av transformert DNA er satt inn.
- ved hjelp av RFLP-kartlegging er det vist at det rekombinante fragmentet med *cry1Ab*- og *pat*-genene er lokalisert på den korte armen til kromosom 8
- spaltingsanalyse over flere generasjoner viser at genene *cry1Ab* og *pat* er tett koblet og segregerer som et enkelt, dominant Mendelsk lokus.
- nesten alle plantedeler uttrykker CRY1Ab-proteinet. PAT-enzymet uttrykkes kun i blad og deler av hann- og hunn blomster. Ingen andre innsatte nukleotidsekvenser blir uttrykt.

Krysning over seks generasjoner og tre selvpollineringsgenerasjoner viser at det rekombinante fragmentet med *cry1Ab* og *pat* genene er stabilt inkorporert i maisgenomet.

Delkonklusjon

Faggruppen har tidligere vurdert de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av proteinene og funnet at informasjonen er tilstrekkelig (VKM 2007). Faggruppen konkluderer med at karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i Bt11 er tilfredsstillende

2.2.2 Maislinje MIR604

Beskrivelse av egenskaper, transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

Den genmodifiserte maislinjen MIR604 uttrykker insektsresistens og mannosetoleranse. Bakgrunnen for insektsresistens er at planten uttrykker en variant av bakterieprotein Cry3A (*mcry3A*). *mCry3A* er fremkommet ved endringer i basesekvensen til *cry3A*-genet, endringer som medfører optimalt uttrykk i mais. Basesekvensen til *mcry3A*-genet stammer fra jordbakterien *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. *mCry3A* toksinet, som uttrykkes av *mcry3A* gen, er et toksin som gir planten toleranse mot enkelte billearter i slekten *Diabrotica*.

Til transformasjon er brukt *Agrobacterium*-mediert transformering av umodne maisceller. Den binære vektoren pZM26 som inneholder et rekombinant DNA fragment, ble benyttet til å transformere celler fra den umodifisert maislinjen. Et rekombinante DNA-fragmentene (T-DNA) er satt inn i maisgenomet. T-DNAet inneholder en *mcry3A* ekspresjonskasset. Ekspresjonskassetten inneholder: *mcry3A*-gen, promotor MTL fra mais, mais sin *ZmUbiIntron* promotor og mais polyubiquitin genes første intron, *pmi* gen fra *E. coli*, samt 3' ikke-translatert område fra nopalinsyntase (NOS) området fra *Agrobacterium tumefaciens*. NOS avslutter (terminerer) transkripsjonen. DNA-fragmentet inneholder ikke antibiotikaresistensgener.

Karakterisering av geninnsettingen

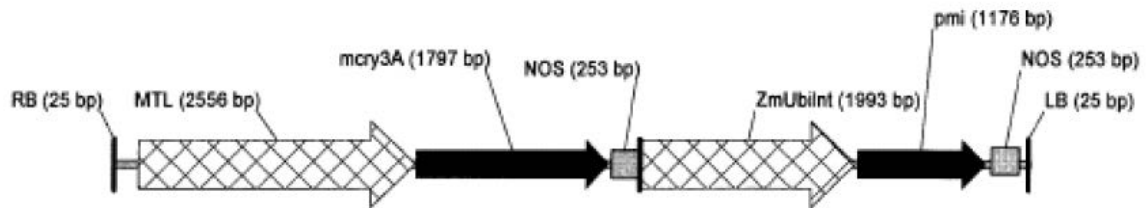
Southern blot-, TaqMan PCR- og sekvensanalyse av DNA isolert fra blad, viser at et nesten fullengde kopi av pZM26 rekombinante DNA-fragment er satt inn i maisens genom. Molekylærbiologisk karakterisering viser at det er satt inn bare en kopi av det rekombinant DNA-fragmentet i maisens genom.

Beskrivelse av de innsatte genene

DNA fragmentet inneholder følgende gener og DNA elementer (se figur 2):

mCry3A ekspresjonskasset

- a) MTL promotor fra mais, fra et metallotionin-likende protein, hovedsakelig ekspresjon i røtter
- b) *mcry3A* modifisert versjon av gen fra *Bacillus thuringiensis*. Genet er optimalisert for uttrykk i mais.
- c) NOS terminator, kommer fra *Agrobacterium tumefaciens*
- d) *ZmUbiIntron* promotor fra mais polyubiquitin gen, inneholder genes første intron
- e) *pmi* *pmi* gen uttrykker enzymet fosfomannose isomeras, gen stammer fra *E. coli*
- f) NOS terminator, 3' DNA sekvens som avslutter transkripsjonen, kommer fra *Agrobacterium tumefaciens*



Figur 2. Rekombinant DNA fragment fra plasmidet pZM26.

Molekylærbiologiske analyser

Molekylærbiologiske analyser viser at det rekombinante fragmentet i planten inneholder de samme gener og genelementer som er på det tilsvarende T-DNA fragmentet i vektoren pZM26. Det er kuttet bort 44 bp fra 5'- og 43 bp fra 3'-delen av DNA fragmentet. Totalt er 8416 bp av T-DNAet satt inn i maisen. Det er også funnet tre nukleotidendringer i T-DNAet. En av endringene er i *MTL*-promoterens. De to andre er i den kodende delen av *pmi* genet. Disse endringene medfører to aminosyre-endringer, valin i posisjon 61 er byttet ut med alanin (V61A) og glutamin i posisjon 210 med histidin (Q210H). Den første endringen er en konservativ endring, begge er alifatiske aminosyrer. Den andre endringen er substitusjonen av en syregruppe med en basisk gruppe. Disse endringene har ikke resultert i endringer i enzymets funksjon. Det er ikke påvist vektorsekvenser som ligger utenfor høyre- og venstre grense.

Western blot og påvisning med polyklonale antistoffer viser at både mCry3A og PMI proteinene har de forventede molekylvektene. mCry3A ble påvist i alt plantevev med unntak i pollen.

Det er ikke funnet at det er utført bioaktivitet-assay med rensset planteproduisert mCry3A-toksin, heller ikke med *E. coli* produsert mCry3A-toksin.

Informasjon vedr. uttrykk av introduserte gener og åpne leserammer (ORF)

Uttrykket av mCry3A- og PMI-proteiner ble målt vha ELISA på to ulike utviklingsstadier (blomstring og modning) i to ulike hybridlinjer og en innavlet linje avledet fra MIR604. Prøvene som er analyserte stammer fra et feltforsøk utført på Syngentas forsøksstasjon i USA i 2006. Forsøksfeltet bestod av et fullstendig randomisert blokkdesign med fem gjentak. Det ble tatt ut to + to prøver av maisplantene fra hver blokk. Prøvene ble tatt av planter fra en hybridlinje og en innavlet linje avledet av MIR604. Detaljer av disse analysene betraktes av Syngenta som konfidensiell informasjon.

Med unntak av pollen og korn ble det påvist mCry3A-protein i alle undersøkte vev. I gjennomsnitt over begge vekststadier ble konsentrasjonen av mCry3A målt til 34,1 µg/g tørrvekt i blad (SD=5,1, variasjonsbredde = 28,2 – 39,7), mens innholdet i røtter og hel plante ble målt til henholdsvis 17,4 µg/g tørrvekt (SD=2,1, variasjonsbredde = 12,9 – 25,5) og 15,3 µg/g tørrvekt (SD=2,7, variasjonsbredde = 11,3 – 20,0).

Det ble påvist PMI-protein i alle vev. Gjennomsnittlig mengde i blad ble målt til 14,7 µg/g tørrvekt (SD=1,1, variasjonsbredde = 11,7 – 16,3), mens innholdet av PMI i røtter og hel plante ble målt til henholdsvis 5,2 µg/g tørrvekt (SD=0,7, variasjonsbredde = 3,8 – 6,5) og 10,0 µg/g tørrvekt (SD=1,0, variasjonsbredde = 8,0 – 12,5). I modne korn ble nivået av PMI målt til 2,9 µg/g tørrvekt (SD=1,0, variasjonsbredde = 1,4 – 4,8), mens det ble funnet 74,3 µg/g tørrvekt i pollen (SD=6,9, variasjonsbredde = 68,3 – 90,8).

Det er gjort studier for å påvise åpne leserammer i 5'- og 3' flankerende ende til det rekombinante DNA-fragmentet i maisens genom.. Det er søkt på seks potensiell åpne leserammer både i 5'- og 3' flankerende områder. Teoretiske analyser av mulige polypeptider fra hver leseramme v.h.a. allergen (AD6)-, toksin (TOXIN5)- og peptid (ALLPEPTIDES)-databasene viser ingen biologisk relevante strukturelle likheter til allergener, toksiner og farmakologiske aktive proteiner. Resultatene fra disse teoretiske analysene viser at det er lite sannsynlig at dersom noen av disse leserammene skulle bli

transkribert vil resultere i polypeptider som medfører potensielle toksiske, allergene eller har uheldige helsemessige konsekvenser.

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

Stabilitet av det innsatte rekombinante fragmentet er vist både ved spaltingsanalyser og Southern blot. Genetisk stabilitet ble evaluert i planter fra tilbakekryssingsgenerasjonene BC4, BC5 og BC6. Det ble ikke funnet forskjellig båndmønster mellom de ulike generasjonene, og det konkluderes med at det er kun én kopi av ekspresjonskassetten i MIR604, og bruttostørrelsen på det innsatte DNA-fragmentet er intakt. Videre er fenotypisk stabilitet demonstrert ved spaltingsdata fra fire tilbakekryssingsgenerasjoner. Frø fra disse generasjonene ble dyrket i veksthus, og bladprøver analysert for mCry3A og PMI vha Southern blot. Analysene viser stabilt uttrykk av mCry3A- og PMI- proteiner over generasjoner.

Delkonklusjon

Faggruppen har tidligere vurdert de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av proteinene og funnet at informasjonen er tilstrekkelig (VKM 2005a). Faggruppen konkluderer med at karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i MIR604 er tilfredsstillende

2.2.3 Maislinje GA21

Beskrivelse av egenskaper og virkningsmekanismer

Den genmodifiserte maislinjen GA21 uttrykker toleranse mot N-fosfonometylglycin (glyfosat). Bakgrunnen for glyfosattoleransen er et modifisert *epsps*-gen (*mepsps*-gen), som stammer fra mais, og som koder for enzymet 5-enolpyruvylsikumat-3-fosfatsyntetase. Enzymet omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikumat-3-fosfat, som er viktige metabolitter i syntesen av aromatiske aminosyrer. Alle planter og mikroorganismer inneholder dette enzymet. Glyfosat virker som en kompetitiv hemmer av EPSPS mht fosfoenolpyruvat og som en non-kompetitiv hemmer mht sikimat-3-fosfat (Steinrucken & Amrhein 1984). Hemming av EPSPS blokkerer derved biosyntesen av aromatiske aminosyrer i planter, og dette resulterer i celledød. I motsetning til plantens EPSPS-enzym er det modifiserte mEPSPS-enzymet fra mais også aktivt ved nærvær av glyfosat.

Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

Modifisert *epsps*-gen (*mepsps*-gen) ble dannet ved å klonere villtype mais *epsps*-gen inn i plasmidet pDPG434 og deretter introdusere to mutasjoner med in vitro mutasjonsteknikk. pDPG434 plasmidet inneholder foruten andre gener også *bla*-genet som koder for ampicillinresistens. *mEpsps*-genet sitter på et 3,4 kilobase(kb) stort NotI-restriksjonsenzymfragment, som også inneholder en ris aktinpromoter og -intron (*r-act P+I*), et optimalisert kloroplast overføringspeptid (OTP), genelementer fra mais og solsikke, og en nopalinsyntase 3'-ende terminatorsekvens (NOS3'). Ampicillinresistensgenet sitter utenfor NotI restriksjonsenzym-fragmentet. NotI-fragmentet ble klippet ut av plasmidet med NotI restriksjonsenzym og overført til embryomaisceller med partikkelaksellerasjonsmetoden. NotI-fragmentet inneholder ikke antibiotikaresistensgen. Transformanter ble selektert ved at de overlevde og vokste i nærvær av glyfosat.

Karakterisering av geninnsettingen

Southern blot og PCR har blitt brukt for å karakterisere det rekombinante DNA-fragmentet i planten. Molekylærbiologisk karakterisering viser at et rekombinant DNA fragment på 18,5 kb er satt inn i maisens genom. Analyser viser at dette fragmentet inneholder tre fullstendige kopier av mEPSPS kassetten og tre avkortet mEPSPS kassetter.

Beskrivelse av de innsatte genene:

Det er her kun beskrevet en fullstendig mEPSPS kassett. mEPSPS kassetten inneholder følgende gener og DNA elementer (se figur 3):

mepsps- ekspressionskasset

- a) P-ract1 promoter fra risaktin-gen, inneholder exon 1
- b) *ract1* intron intron fra risaktin-gen, uttrykkes ikke i planten
- c) OTP DNA sekvens som koder for kloroplastoverføringspeptid, fra solsikke (*Helianthus annuus*) og mais (*Zea mays*)
- d) *mepsps* modifisert *mepsps* gen fra mais(*Zea mays*), resistent mot glyfosat
- e) NOS 3' 3' DNA sekvens som avslutter transkripsjonen, kommer fra nopalinsyntase gen til *Agrobacterium tumefaciens*, uttrykkes ikke i planten



Figur 3. Rekombinant *mepsps* DNA fragment i maisens genom.

Molekylærbiologiske analyser

Molekylærbiologiske analyser viser at det rekombinant DNA fragment på 18,5 kb i planten inneholder seks påfølgende områder som stammer fra 3,49 kb *NotI*-restriksjonsfragment fra plasmidet pDPG434. Kopiene fra dette 3,4 kb rekombinante DNA fragmentet blir av Syngenta benevnt som Copy 1 til 6.

Copy 1 inneholder et avkortet *r-act P* (5' delesjon på 696 bp), og henholdsvis fullstendig *r-act I*, OTP, *mepsps* og NOS3'-terminator.

Copy 2, 3 og 4 inneholder inntakt *mepsps* 3,49 kb *NotI*-restriksjons DNA fragmenter.

Copy 5 inneholder en avkortet mEPSPS kasset som består av fullengde *r-act P+I*, OTP, og et ufullstendig *mepsps*-gen.

Copy 6 inneholder en avkortet mEPSPS kasset som består av *r-act P*

Southern-blot analyse viser at disse kopiene arves som et enkelt lokus.

Western blot-analyse viste kun fullengde mEPSPS-protein og ingen trunkerte mEPSPS-proteiner, slik at det ufullstendige *mepsps*-genet sannsynligvis ikke kan uttrykkes i maisplanten. Med Northern-blot analyser med spesifikk *mepsps*-probe ble det ikke påvist trunkert *mepsps*-gen fra Copy 5 DNA fragmentet.

Analyser av genomisk 5' flankesekvenser til Copy 1 viste homologi til kloroplastsekvenser fra mais, mens analyser av 3' sekvenser til Copy 6 viste homologi til flere maissekvenser. Disse sekvensene var repetitive sekvenser.

Molekylærbiologiske analyser viser at det rekombinante fragmentet i planten inneholder de samme gener og genelementer som på *NotI*-fragmentet. Genene på det rekombinante DNA-fragmentet i GA21 åkermais uttrykker det samme mEPSPS-proteinet som uttrykkes i *NotI*-fragmentet.

Informasjon vedr. uttrykk av introduserte gener og åpne leserammer (ORF)

Uttrykket av mEPSPS-protein er målt vha ELISA på to forskjellige utviklingsstadier i en hybridlinje og en innavlet linje avledet fra GA21. Prøvene som er analyserte stammer fra et feltforsøk utført på Syngentas forsøksstasjon i USA i 2006. Forsøksfeltet bestod av et fullstendig randomisert blokkdesign med fem gjentak. Det ble tatt ut to + to prøver av maisplantene fra blokk. Detaljer av disse analysene betraktes av Syngenta som konfidensiell informasjon.

Det ble påvist mEPSPS-protein i alle undersøkte vev. I gjennomsnitt over begge utviklingsstadier ble konsentrasjonen av mEPSPS-protein målt til 32,4 µg/g tørrvekt i blad (SD=2,5, variasjonsbredde = 26,4 – 37,8), mens innholdet i røtter ble målt til 17,7 µg/g tørrvekt (SD=2,0, variasjonsbredde = 13,6 – 21,2). Videre ble konsentrasjonen i hel plante målt til 21,5 µg/g tørrvekt (SD=0,8, variasjonsbredde = 19,4 – 23,2), mens innholdet i modne korn og pollen ble målt til henholdsvis 6,8 µg/g tørrvekt (SD=0,6, variasjonsbredde = 5,2 - 8,5) og 178,8 µg/g tørrvekt. (SD=7,4, variasjonsbredde = 96,7 – 194,7).

Av seks mulige åpne leserammer til de to flankesekvensene er det påvist to åpne leserammer henholdsvis i 5' – og 3'-flankesekvens. Teoretiske *in silico* analyser av mulige polypeptider fra hver av disse leserammene v.h.a. National Center for Biotechnology Information (NCBI) Entrez Protein Database (NCBI, 2005), som inneholder alle publiserte tilgjengelige proteinsekvenser, viser ingen relevante strukturelle likheter til toksiner. Teoretiske *in silico* analyser av mulige polypeptider fra hver av disse leserammene ble også sammenlignet med Syngenta Biotechnology, Inc. (SBI) Allergen Database. Denne databasen inneholder aminosyresekvenser fra kjent og antatte allergene proteiner fra databasene GenPept, PIR, SWISS-PROT, List of Allergens database (INt Union Immun Societies), FARRP protein allergen database. Resultatene fra disse teoretiske analysene viser at det er lite sannsynlig at det dersom noen av disse leserammene skulle bli transkribert vil resultere i polypeptider som medfører potensielle toksiske eller allergene konsekvenser

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

Søker viser til en rekke undersøkelser som dokumenterer at det rekombinante DNA-innskuddet er stabilt integrert i maisgenomet, og stabilt nedarvet over generasjoner. Analyser av Southern blot viser stabilitet av det rekombinante innskuddet over 3 selvpollineringsgenerasjoner (BC1, BC2 og BC3). Videre er fenotypisk stabilitet demonstrert ved spaltingsdata fra tre tilbakekryssingsgenerasjoner. Frø fra disse generasjonene ble dyrket i veksthus, og bladprøver analysert for konsentrasjon av mEPSPS-protein. Analysene viser stabilt uttrykk av mEPSPS-proteinet over generasjoner.

I søknad fra 2005 (EFSA/GMO/UK/2005/19) vises det ellers til overvåking av fenotypisk stabilitet i over 70 feltforsøk med GA21 siden 1994 i USA, og åtte feltforsøk siden 1996 i EU.

Delkonklusjon

Faggruppen har tidligere vurdert karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i GA21, og de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av proteinet til å være tilfredsstillende (VKM 2006).

2.2.4 Hybriden Bt11 x MIR604 x GA21

Molekylær karakterisering

Bt11 x MIR604 x GA21 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom maislinjene Bt11, MIR604 og GA21. Molekylærbiologiske analyser viser at de rekombinante fragmentene i planten inneholder de samme gener og genelementer som er i foreldrelinjene Bt11, MIR604 og GA21.

Informasjon vedr. uttrykk av introduserte gener

Uttrykket av Cry1Ab-, PAT-, mCry3Ab-, PMI- og mEPSPS-proteinene er undersøkt ved hjelp av ELISA i to ulike utviklingsstadier i hybridlinje Bt11 x MIR604 x GA21 og innavlete linjer avledet fra Bt11, MIR604 og GA21. Konsentrasjonen av de aktuelle proteinene ble målt i blad, røtter, hel19

plante og pollen ved blomstring. Videre ble nivået av Cry1Ab-, PAT-, mCry3Ab-, PMI- og mEPSPS-proteinene målt i frø ved fysiologisk modning.

Konsentrasjonen av samtlige proteiner ble i hovedsak funnet å være sammenlignbare med nivået i de respektive foreldrelinjene. Det ble imidlertid funnet signifikant lavere innhold av Cry1Ab i rotprøver fra trippelhybriden sammenlignet med foreldrelinjen Bt11. Tilsvarende ble det funnet signifikant lavere nivå av mEPSPS-protein i Bt11 x MIR604 x GA21 sammenlignet med GA21. Syngenta har klassifisert analyser av proteinuttrykk som konfidensiell informasjon.

Flankerende sekvenser til de rekombinante DNA-fragmentene i Bt11 x MIR604 x GA21 er ikke sekvensert. Syngenta har imidlertid foretatt Southern-blot analyser av DNA fra Bt11 x MIR604 x GA21. Data fra disse analysene viser at de respektive rekombinante fragmenter fra Bt11, MIR604 og GA21 er stabilt integrert i hybridene.

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

Southern blot av DNA fra Bt11 x MIR604 x GA21-hybridene viser at de rekombinante DNA fragmentene fra henholdsvis Bt11, MIR604 og GA21 er integrert i Bt11 x MIR604 x GA21. Detaljer av de komparative Southern-blot analyser av Bt11, MIR604, GA21 og Bt11 x MIR604 x GA21 betraktes av Syngenta som konfidensiell informasjon. Søker viser ellers til at det kun er F₁-frø av Bt11 x MIR604 x GA21, som produseres ved konvensjonelle kryssinger mellom de transgene foreldrelinjene, som benyttes som såfrø. Frø fra F₂-generasjonen høstes til ulike formål og benyttes ikke som såfrø.

Delkonklusjon

Hybriden Bt11 x MIR604 x GA21 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom maislinjene Bt11, MIR604 og GA21. Spaltingsdata og Southern-analyser indikerer at de innsatte strukturene nedarves stabilt, og at antall, struktur og organisering av disse genkonstruksjonene er ekvivalent med de som finnes i foreldrelinjene. Nivåene av Cry1Ab-, PAT-, mCry3Ab-, PMI- og mEPSPS-proteinene i vegetativt vev og frø er sammenlignbare med uttrykk av tilsvarende proteinprodukter i foreldrelinjene.

3. Komparative analyser

3.1. Valg av komparator og forsøksdesign

I følge dokumentasjon fra Syngenta er det foretatt analyser av ernæringsmessige viktige komponenter og registreringer av agronomiske karakterer i en serie feltforsøk i USA vekstsesongen 2006.

Prøver for analyser av ernæringsmessige komponenter ble hentet fra feltforsøk på seks lokaliteter i sentrale dyrkingsområder for mais (Iowa, Illinois, Minnesota og Nebraska). Hvert forsøksfelt bestod av et fullstendig randomisert blokkdesign med fire gjentak. En umodifisert maishybrid (NP2673/NP2171), med samme genetisk bakgrunn som testhybriden, ble benyttet som kontroll. I følge søker er navnet på den umodifiserte maishybriden er å betrakte som konfidensiell informasjon.

Registreringer av agronomiske karakterer ble foretatt i feltforsøk på 10 ulike lokaliteter i statene i Iowa, Illinois, Indiana, Minnesota, Nebraska, Sør Dakota og Wisconsin. I disse forsøkene ble det benyttet en testhybridlinje av Bt11 x MIR604 x GA21, samt den ikke-transgene kontrollhybriden NP2673/NP2171. Hvert forsøksfelt bestod av et fullstendig randomisert blokkdesign med fem gjentak.

Statistiske analyser

I Nordisk ministerråds rapport "Safety Assessment of Novel Food Plants: Chemical Analytical Approaches to the Determination of Substantial Equivalence" (TemaNord 1998), anbefales det at tilstrekkelig antall prøver må analyseres for å få adekvat sensitivitet for statistisk analyse. Spredning₂₀

i enkeltparametere skal være sammenlignbare for genetisk modifisert plante og umodifisert plante. I rapporten er det anbefalt at spredningen i enkeltverdier bør ligge innenfor $\pm 20\%$. Faggruppe for genmodifiserte organismer benytter denne anbefalingen som grunnlag for vurdering av forsøksresultatene.

3.2. Analyser av ernæringsmessige komponenter

Hovedkomponenter i maiskorn og andre plantedeler

OECDs konsensusdokument for mais er fulgt med hensyn på valg av analyseparametre for maishybriden Bt11 x MIR604 x GA21 og kontrollhybrid. Når det gjelder fôr-komponentene ble det analysert for innhold av aske, fett, protein, vann, ADF (acid detergent fibre), NDF (neutral detergent fibre), fosfor, kalsium og karbohydrater. I korn ble følgende parametre analysert; protein, fett, aske, vann, karbohydrater, ADF, NDF, aminosyrer, fettsyrer (linol-, olje-, palmitin-, stearin- og linolensyre), fosfor, jern, kalium, kalsium, kobber, magnesium, mangan, natrium, selen, sink, vitaminene B1, B2, B3, B6, E, folinsyre og β -karoten, de sekundære metabolittene furfural, ferulsyre og p-kumarinsyre, og anti-næringsstoffene fytinsyre, inositol, trypsinhemmer og raffinose. Analysene ble utført under god laboratoriepraksis (GLP).

Det ble ikke funnet signifikante forskjeller for hovedkomponentene protein, aske, karbohydrater, ADF, NDF og vann i fôr. Det ble imidlertid påvist signifikant genotype x sted-samspill for fett. I prøver av maiskorn ble det er funnet signifikante forskjeller mellom Bt11 x MIR604 x GA21 og kontroll for protein, men ikke for de øvrige hovedkomponentene fett, karbohydrater, ADF, NDF, TDF og stivelse. Analyser over komponenter i maisplanten viser at verdier for alle disse hovedkomponentene ligger innenfor typiske verdiområder for andre maissorter som er publisert.

Fettsyresammensetning i maiskorn

Fettsyresammensetningen for Bt11 x MIR604 x GA21 er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Det ble analysert for innhold av 5 fettsyrer. Resultatene av variansanalysen (ANOVA) viser ingen signifikante forskjeller. Forskjellene som er målt er mindre enn 10 %, og verdiene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2006).

Aminosyrer i maiskorn

Både essensielle og ikke-essensielle aminosyrer ble analysert. Totalt 18 aminosyrer er målt i henhold til OECDs konsensusdokument. Resultatene av variansanalysen (ANOVA) viser signifikante forskjeller for flere aminosyrer på genotype-nivå. I tillegg ble det påvist genotype x sted-samspill for enkelte aminosyrer. Alle verdiene ligger innenfor $\pm 10\%$, og for alle aminosyrene ligger verdiene innenfor de typiske verdiene som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2006).

Vitaminer

I henhold til OECDs konsensusdokument for mais bør følgende vitaminer analyseres: A, B1, B2, B6, C, E, folat og niacin. I følge dokumentasjonen fra søker er ikke innholdet av vit. C målt. Vitamin A er målt som β -karoten. Innholdet av vitamin E var lavere enn påvisningsgrensen både i umodifisert og modifisert mais. For vitamin B1 er det funnet statistisk signifikante forskjeller mellom test- og kontrollinje. Verdiene ligger innenfor typiske verdier som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2006).

Mineraler

Innholdet av mineraler er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Innholdet av natrium var lavere enn påvisningsgrensen både i umodifisert og modifisert mais. For sink er det funnet statistisk signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll, mens det er påvist signifikant genotype x sted-samspill for kalsium. Det er ikke funnet signifikante forskjeller for andre analyserte mineraler. De statistiske forskjellene som er påvist er lavere enn 20 %, og alle verdiene ligger innenfor typiske verdier som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2006).

Sekundære metabolitter og antiernæringskomponenter

Sekundære metabolitter og antiernæringskomponenter er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Det er ikke funnet signifikante forskjeller for påviste sekundære metabolitter og antiernæringskomponenter. Mengdene av raffinose og furfural var lavere enn påvisningsgrensen. Verdiene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2006).

3.3. Agronomiske egenskaper

I følge dokumentasjon fra søker ble det foretatt registreringer av opp til 19 agronomiske og morfologiske karakterer knyttet til reproduksjon, spredning, vegetativ vekst, sjukdoms- og insektsresistens, samt toleranse mot ulike abiotiske stressfaktorer på hver lokalitet. Det ble ikke gjennomført registreringer av samtlige parametere på hvert forsøkssted. Det er foretatt statistiske analyser innen lokaliteter og kombinerte analyser over lokaliteter for hver karakter. De kombinerte analysene viser signifikant ($p \leq 0,05$) høyere frøavling av Bt11 x MIR604 x GA21 sammenlignet med den nær-isogene kontrollen. Videre ble det påvist signifikante forskjeller mellom test- og kontrollinje for plantehøyde og vanninnhold i frø ved høsting. For de øvrige karakterene ble det ikke funnet signifikante forskjeller.

Søker konkluderer med at observerte verdier av fenotypiske og agronomiske karakterer ligger innenfor forventet variasjonsområde for mais. Syngenta viser også til at feltforsøk med foreldrelinjene Bt11, MIR604 og GA21 på en rekke lokaliteter i USA og Argentina ikke har avdekket signifikante forskjeller i forhold til kontrollsorter med hensyn på agronomiske karakterer.

3.4. Delkonklusjon

Analysene av ernæringsmessige viktige komponenter viser statistiske forskjeller i enkeltparametere. Verdiene for de enkelte analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen. Faggruppen anser at de forskjellene som er påvist, ikke har noen helsemessig betydning. Undersøkelsene av agronomiske karakterer viser små eller ingen signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll.

4. Dokumentasjon av toksisitet og allergenitet

4.1. Toksisitet

For toksisitetssudier med mEPS-SPS-, PAT-, PMI og Cry-proteinene henviser Syngenta til studier som er dokumentert i andre søknader.

Fôringsforsøk på rotter

Det ble ikke utført et 13 ukers fôringsforsøk på rotter. Syngenta henviser til at 13 ukers fôringsstudier med fôr fra foreldrelinjene ikke har vist negative helseeffekter på rotter.

Fôringsforsøk på broiler

Søknaden inneholder dokumentasjon fra 49-dagers fôringsforsøk på broilere. Informasjon blir av Syngenta betraktet som konfidensiell informasjon. Det ble foretatt fôringsstudier på hann- og hunn fugl. Fôringsstudiene viser ingen vesentlige endringer ved fôring med maiskorn fra Bt11 x MIR604 x GA21 sammenlignet med ikke-transgen kontroll- og referansehybrid.

4.2. Allergenitet

Bt-proteiner

Til tross for vel 50 års bruk av plantevernmidler med *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* er det ingen bekreftede rapporter over øyeblikkelige eller forsinkede allergiske reaksjoner til tross for betydelig human oral-, dermal- og inhalasjonseksposering (EHC 1999). Flesteparten av Bt-plantevernmodler inneholder krystalltoksinen (protoksin) og levende sporer fra Bt-bakterien (EHC 1999). Laboratoriestudier med pattedyr indikerer heller ingen potensielle allergiske reaksjoner mot *Bacillus thuringiensis* eller dets komponenter, innbefattet delta-endotoksinet i krystallproteinene.

Adjuvans (fremming av immunreaksjon mot andre stoffer)

Det har ikke vært utført immunologiske studier med de transgene produktene. Det er vist at Cry1Ac-proteinene binder seg til musetarmoverflaten (Vazquez-Padron *et al.* 2000a) og induserer immunologiske reaksjoner mot seg selv og mot proteiner gitt samtidig (Vazquez *et al.* 1999). Immunologisk kartlegging av systemisk og mucosal immunreaksjon på Cry1Ac har videre påvist at mus lager både systemisk IgM, IgG og sekretorisk IgA etter intraperitoneal og intragastrisk immunisering (Vazquez-Padron *et al.* 2000b). Det er ukjent om Cry1Ac-proteinene som er benyttet i disse studiene, tilsvarer Cry1Ab og mCry3A-toksiner som den transgene maislinjen lager. Det er vist at domene II fra Cry1Ab og Cry1Ac genererer ulik immunologisk respons i kanin (Vazquez-Padron *et al.* 1998). I en annen studie er det vist at Cry1Ac hadde utpreget mucosal adjuvanseffekt ved å potensere IgM-, IgG- og IgA-responsen mot hepatittvirusantigen og bovint serumalbumin som ble gitt med sondeføring samtidig med Cry1Ac (Vazquez *et al.* 1999). Produksjonen av IgE-antistoff, som er knyttet til allergisk reaksjon, ble ikke målt. Også i tidligere studier (Prasad & Shetna 1975) er det påvist adjuvanseffekt av krystallprotein fra *Bacillus thuringiensis*. Adjuvanseffekten av Cry1Ac er bekreftet ved intranasal og intraperitoneal immunisering i to senere publikasjoner med henholdsvis pneumokokk-antigen (Moreno-Fierros *et al.* 2003) og amøbe-lysate (Rojas-Hernández *et al.* 2004). Adjuvanseffekten av Cry1Ac ble funnet å være like sterk som adjuvanseffekten av koleratoksin (Vazquez-Padron *et al.* 1999), som er et mye brukt slimhinneadjuvans i eksperimentelle studier av vaksinasjon og av allergi, og som regnes for å være det sterkeste slimhinneadjuvans vi kjenner.

Det gjennomsnittlige forbruket av mais i Europa er i følge søker 8,8 g/person/dag, mens for eksempel i Afrika er forbruket 106,2 g/person/dag (GEMS/FOOD 2003). Spesielle målgrupper, som barn, kan ha et langt større inntak av mais enn det beregnede gjennomsnittlige inntaket i Europa. I Frankrike er det rapporterte inntaket for store porsjoner, 97,5 persentil, for barn under 6 år 8,3 g/kg kroppsvekt/dag og for voksne 4,17 g/kg kroppsvekt/dag (FAO/WHO 2003). I henhold til Syngenta kan samlet mengde Cry1Ab og mCry3A i maiskorn være ca. 2 µg/g tørrvekt korn. Teoretiske beregninger fra faggruppen viser at dersom alt maisinntak i Europa kommer fra Bt11 x MIR604 x GA21 vil dette kunne medføre et inntak for voksne på ca 20 µg Cry-protein/person/dag. Teoretiske beregninger fra faggruppen viser at for barn som spiser store porsjoner blir inntaket ca. 17 µg Cry-protein/kg kroppsvekt/dag og for voksne ca. 8 µg/kg kroppsvekt/dag. De totale mengdene for henholdsvis barn og voksne blir da 290 µg/barn/dag og 480 µg/person/dag. De mengder Cry1Ac som ga mucosal adjuvanseffekt ved sondeføring av mus var fra 0,1 µg til 100 µg (Vazquez *et al.* 1999).

Et realistisk inntak av Cry-protein vil være vesentlig lavere enn de mengdene som er angitt ovenfor. Mais er en bulkvare hvor flere typer mais fra mange åkre samles i felles siloer før videre prosessering. Man vil således aldri spise 100 % Bt11 x MIR604 x GA21-mais. Vi spiser stort sett prosessert mais hvor, i mange tilfeller, proteinene er helt eller delvis degradert eller er fjernet. Søker oppgir at både Cry1Ab og mCry3A brytes raskt ned i magesaft. Eksposering av tarmepitel for Cry1Ab- og mCry3A-protein forventes dermed å være marginal.

De adjuvansdoser som brukes for immunisering av mus og mennesker i andre sammenhenger er ofte av samme størrelsesorden, det vil si at om lag samme dose brukes til mus og menneske. Det er mulig at Cry1Ab og mCry3A som benyttes i Bt11 x MIR604 x GA21 kan ha tilsvarende effekter som vist for det beslektede Cry1Ac-proteinene, som induserer immunologiske reaksjoner mot seg selv og økt reaksjon mot proteiner gitt samtidig. Dersom Cry1Ab og mCry3A har tilsvarende adjuvanseffekt 23

som det beslektede Cry1Ac-proteinet er rapportert å ha, vil dette teoretisk kunne føre til økt utvikling av allergi mot matvarer spist sammen med maisen, foruten mot maisen selv. Matallergi mot mais er lite vanlig i Norge, men et problem i andre områder, bl.a. Nord-Italia. Man ville forvente at adjuvanseffekten kom til syne først og fremst som økt forekomst av allergi mot de matvarene der matallergi fra før er vanligst. IgE ble ikke målt i de refererte studiene av adjuvanseffekt av Cry1Ac-proteinet.

Adjuvanseffekt og induksjon av IgE er ikke vist, verken for Cry1Ab eller mCry3A. Det finnes lite litteratur på området omkring betydning av adjuvanter for induksjon av IgE-mediert allergisk respons. Den foreliggende litteratur tyder i flere tilfeller på at betydningen er liten. I en musemodell for allergiutvikling mot lupin ga bruk av koleratoksin (CT) økt immunrespons for andre immunoglobulin klasser, men ingen IgE respons. Forfatterne antyder at IgE respons er mer avhengig av indre egenskaper ved allergenene og ikke CT-adjuvans (Foss *et al.* 2006). I en lignende rottemodell viste CT også kun en begrenset effekt på utvikling av peanøttallergi (de Jonge *et al.* 2007). Peanøttallergi-artikkelen viste også at det var krevende å klare å indusere allergi i rottene. Rotter som gikk på streng diett i 3 generasjoner ga IgE respons, mens rotter som gikk på allergenfri diett i én generasjon ga ikke IgE respons etter indusering. Disse forsøkene indikerer en begrenset betydning av adjuvans for utvikling av IgE mediert allergi. Utvikling av matallergi skyldes et komplekst samspill av faktorer bla genetisk predisposisjon, alder ved introduksjon av allergenet, amming, sammensetning av ernæring, sammensetning av tarmfloraen og infeksjonsstatus i mage-tarm systemet (van Wijk & Knippels 2007).

Maten vi spiser inneholder en lang rekke stoffer som virker som adjuvanter (Berin & Schreffler 2008). Eksempler på disse stoffene er glukaner og lectiner som er vanlige i alt plantemateriale, proteinaser og chitin, en hovedbestanddel i cellevegg hos sopp. Det kan derfor reises tvil om tilstedeværelsen av små mengder av et adjuvant protein vil bidra til noen økt risiko for induksjon av IgE dannelse. Det anføres i tillegg at Cry-proteinene har en 50 år lang historie med trygg bruk. Det er tillatt å sprøyte mais med *Bt* helt frem til høsting. Maislinjen MON810, som inneholder Cry1Ab-proteinet, har vært dyrket og konsumert siden 1996.

4.3. Delkonklusjon

Et flertall av medlemmene i Faggruppe for genmodifiserte organismer finner det ikke sannsynliggjort at Cry1Ab og mCry3A har egenskaper som fører til hemming av den toleransen som fordøyelsessystemets slimhinner har mot proteiner (adjuvanseffekt). På bakgrunn av at Cry1Ab- og mCry3A-proteinene brytes ned i magesaft og at maten for øvrig inneholder en lang rekke stoffer som virker som adjuvanter, vurderes adjuvansproblemstillingen i forbindelse med Bt11 x MIR604 x GA21 mais til å være neglisjerbar.

Et mindretall av faggruppen (A.H. Nerland, T. Bøhn, A.I. Myhr, C. Linnestad, H. Klungland) finner det vanskelig å vurdere om næringsmidler og fôrvarer fra mais Bt11 x MIR604 x GA21 er mer allergifremkallende enn næringsmidler og fôrvarer fra umodifiserte maiskorn. På bakgrunn av foreliggende eksperimentelle studier i mus, som viser at Cry-proteiner kan hemme den toleransen som fordøyelsessystemets slimhinner har mot proteiner, finner imidlertid disse medlemmene at muligheten for økt allergifremkallende aktivitet hos Bt11 x MIR604 x GA21 med den informasjon vi har tilgang til, ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes. Mindretallet mener at det kan ikke utelukkes at slike effekter kan oppstå ved inntak av maisprodukter som inneholder aktivt Cry1Ab og mCry3A-protein, d.v.s. om Cry1Ab og mCry3A-Cry3Bb1-protein, kan føre til økt allergiutvikling mot andre komponenter i mat som spises samtidig. Adjuvanseffekter er tidligere ikke trukket inn i risikovurdering av mat, men på bakgrunn av økt fokus på matallergi er denne problemstillingen aktualisert.

5. Miljørisikovurdering

Maishybriden Bt11 x MIR604 x GA21 er dannet ved konvensjonelle kryssninger mellom tre innavlede linjer, avledet av maislinjene Bt11, MIR604 og GA21. Foreldrelinjen Bt11 inneholder genet *cry1Ab* som koder for Cry1Ab-proteinet, et δ -endotoksin som gir toleranse mot enkelte skadeinsekter i ordenen *Lepidoptera*. Videre inneholder genkonstruksjonen *pat*-genet, som uttrykker glufosinattoleranse. Foreldrelinjen MIR604 inneholder det bakterielle genet *mcry3A*, som uttrykker mCry3A-proteinet, et toksin som gir planten toleranse mot bladbiller i slekten *Diabrotica*, samt *pmi*-genet som gir mannosetoleranse. Foreldrelinjen GA21 inneholder et modifisert *epsps*-gen (*mepsps*), som uttrykker mEPSPS-enzymet, og som gir toleranse mot herbicider med virkestoff glyfosat.

Syngentas søknad om godkjenning av maishybriden Bt11 x MIR604 x GA21 under EU forordning 1829/2003/EF omfatter bruksområdene fôrvarer, næringsmidler, import og prosessering. Søknaden gjelder ikke dyrking. Miljørisikovurderingen av de transgene maislinjene er derfor avgrenset til mulige effekter av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport og prosessering til mat, fôr og ulike industrielle formål. I tillegg vil indirekte eksponering gjennom gjødsel fra husdyr fôret med genmodifisert mais representere en mulig kilde til uønsket genspredning.

5.1. Potensiale for utilsiktede effekter på fitness relatert til genmodifiseringen

Mais er en ettårig kulturplante som har gjennomgått langvarig og systematisk foredling. Planten krever omfattende kultiveringstiltak, og er generelt ikke i stand til spredning og overlevelse utenfor dyrket mark. Frøene er ubeskyttet, sitter godt festet til kolben, omsluttet av modifiserte blad. Planten er uten evne til naturlig frøspredning, og eventuell frøspredning er derfor primært knyttet til høsting, transport og prosessering.

Maisfrø stiller store krav til spiretemperatur og har ingen frøkvile. Frøplantene er svært sensitive for lave temperaturer. Under våre dyrkingsforhold er det derfor små muligheter for oppspiring og vekst av eventuelle spillfrø. I milde vintre i sørlige områder av Europa kan maisfrø overleve og spire påfølgende vekstsesong, men arten er ikke persistent og etablerer ikke ugraspopulasjoner (Hallauer 2000).

Enkeltplanter av mais finnes av og til forvillet på avfallsplasser, vegkanter og annen brakkmark, men arten etablerer ikke populasjoner utenfor dyrkingsområder (Lid & Lid 2005). Til tross for omfattende dyrking av mais over mange år i Europa, er det ikke påvist noen risiko knyttet til spredning, etablering og invasjon av naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder. Det er ingen stedegne eller introduserte viltvoksende arter i den europeiske flora som mais kan hybridisere med (OECD 2003).

Spredning av mais til andre habitater i Europa er hovedsakelig begrenset av dårlig konkurransevne, manglende frøkvile, mottagelighet for sjukdom og liten toleranse for lave temperaturer. Det er ikke påvist forskjeller mellom den insektresistente maislinjen og konvensjonelle sorter med tilsvarende genetisk bakgrunn for disse karakterene, og det er ikke grunn til å anta at den introduserte egenskapen hos Bt11 x MIR604 x GA21 vil medføre økt fitness utenfor dyrkingsmiljø i forhold til konvensjonelle maissorter.

5.2. Potensiale for genoverføring

En forutsetning for genspredning er tilgjengelige veier for overføring av genetisk materiale, enten via horisontal genoverføring av DNA, eller vertikal genflyt i form av frøspredning og krysspollinering. Eksponering av mikroorganismer for rekombinant DNA skjer under nedbryting av plantemateriale på dyrket mark og/eller pollen i åkrer og omkringliggende arealer. Rekombinant DNA er også en komponent i en rekke mat- og fôrprodukter, som er avledet av plantemateriale fra den transgene²⁵

sorten. Dette medfører at mikroorganismer i fordøyelseskanalen hos mennesker og dyr kan eksponeres for rekombinant DNA. Siden mais ikke har viltvoksende populasjoner eller nærstående arter utenfor dyrking i Europa, vil vertikal genoverføring være knyttet til krysspollinering med konvensjonelle og eventuelle økologiske sorter.

5.2.1 Horisontal genoverføring

Data fra tilgjengelige eksperimentelle studier viser at genoverføring fra transgene planter til bakterier etter all sannsynlighet inntreffer svært sjelden under naturlige forhold, og at denne overføringen forutsetter sekvenshomologi mellom overført DNA og bakterien (EFSA 2004; VKM 2005b).

Ut fra dagens vitenskapelig innsikt med hensyn til barrierer for genoverføring mellom ubeslektede arter og flere års forskning for om mulig å framprovosere tilfeldig overføring av genetisk materiale fra planter til mikroorganismer er det lite som tyder på at transgenene i Bt11 x MIR604 x GA21 skal kunne overføres til andre enn naturens kryssingspartnere ved påvisbare frekvenser i laboratoriestudier. Det er gjort forsøk som ser på stabilitet og opptak av DNA fra tarmkanalen hvor mus er oralt tilført M13 DNA. Det tilførte DNAet var sporbart i avføring opp til syv timer etter føring. Svært små mengder av M13 DNA (<0.1 %) kunne spores i blodbanene i en periode på maksimum 24 timer, mens M13 DNA ble funnet i opptil 24 timer i lever og milt (Schubbert *et al.* 1994). Ved oralt inntak av genmodifisert soya er det vist at DNA er mer stabilt i tarmen hos personer med utlagt tarm sammenlignet med kontrollgruppen (Netherwood *et al.* 2004). I kontrollgruppen ble det ikke påvist GM DNA i feces. Nielsen *et al.* (2000) og De Vries & Wackernagel (2002) har undersøkt persistens av DNA og opptak av GM DNA i jord. I disse laboratorieforskene ble det påvist svært små mengder DNA som var overført fra planter til bakterier. Forutsetningen for at dette kunne skje var sekvenshomologi mellom plantetransgenet og mottagerbakterien. I hvilken grad det forekommer tilfeldig sekvenshomologi mellom plantetransgener og naturlig forekommende bakterier er usikkert, men siden de fleste transgenene inneholder rekombinerte DNA sekvenser fra jordbakterier kan dette ikke utelukkes (Bensasson *et al.*, 2004).

Med bakgrunn i opprinnelse og karakter/egenskaper av de innsatte genene og mangel på seleksjonspress i fordøyelseskanal og/eller miljøet, er sannsynligheten for at horisontal genoverføring vil gi selektive fordeler eller økt fitness på mikroorganismer svært liten (Nielsen 2003). Det er derfor usannsynlig at gener fra Bt11 x MIR604 x GA21 vil etableres stabilt i genomet til mikroorganismer i miljøet eller i fordøyelseskanalen hos mennesker eller dyr. Ut fra tilgjengelig kunnskap er det ikke grunn til å forvente at det vil skje horisontal genoverføring av DNA-materiale fra Bt11 x MIR604 x GA21.

5.2.2 Vertikal genoverføring

Potensialet for krysspollinering mellom Bt11 x MIR604 x GA21 og konvensjonelt foredlete maissorter vil avhenge av omfanget av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport, handtering og prosessering. Det er imidlertid lite sannsynlig at sporadiske enkeltplanter vil spre signifikante mengder pollen til konvensjonelle dyrkingsfelt. Dyrkingsomfanget av mais i Norge er dessuten svært begrenset. Risiko for utkryssing med dyrkede sorter vurderes derfor til å være ubetydelig.

Insekt- og herbicidtoleranse vil ikke representere noen selektiv fordel og økt sannsynlighet for spredning av mais i Europa. Overlevelse hos mais er i hovedsak begrenset av dårlig konkurransevne, manglende frøkvile, mottagelighet for soppsjukdommer og liten frosttoleranse. Som for konvensjonelle sorter er det ingenting som tilsier at eventuelle spillplanter vil overleve til neste vekstsesong eller etablere uønskede populasjoner.

5.3. Potensiale for samspill mellom GMP og målorganismer

Maishybriden Bt11 x MIR604 x GA21 inneholder de bakterielle genene *cryIAb* og *mcry3A*. *CryIAb*-genet koder for et δ -endotoksin som gir resistens mot enkelte skadeinsekter i ordenen *Lepidoptera*, nærmere bestemt maispyralide (*Ostrinia nubilalis*) og enkelte arter i slekten *Sesamia*. Det er

rapportert om enkeltfunn av maispyralide i Vestfold, Telemark og Agder (<http://nhm.uio.no/norlep/>), men arten er ikke rapportert som skadegjører (Meadow 2007). Det er ikke gjort observasjoner av *Sesamia*-arter i Norge. I tillegg uttrykker Bt11 x MIR604 x GA21 mCry3A-proteinet gir plantene resistens mot angrep fra skadegjørere i billeslekten *Diabrotica*, eksempelvis *D. virgifera virgifera* ('Western Corn Rootworm'), *D. barberi* ('Northern Corn Rootworm') og *D. undecimpunctata howardi* ('Southern Corn Rootworm'). Målorganismene for denne transformasjonen er ikke påvist i Norge (<http://www.faunaeur.org/distribution.php>).

Tatt i betraktning tiltenkt bruksområde for maislinjen, vil miljøeksponeringen være begrenset til sporadiske enkeltplanter fra frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Nivået av eksponering av Bt-toksin for eventuelle målorganismer vil derfor være svært lav, og ikke ha noen økologisk betydning i Norge.

5.4. Potensiale for samspill mellom GMP og ikke-målorganismer

Sporadiske spillplanter av Bt11 x MIR604 x GA21 med opphav i utilsiktet frøspredning under ulike omsetningsledd antas ikke å medføre risiko for ikke-målorganismer.

Når det gjelder indirekte eksponering gjennom gjødsel fra husdyr fôret med genmodifisert mais vil mesteparten av Cry-proteinene denatureres av enzymaktivitet (proteaser) i fordøyelseskanalen, og mikrobielle prosesser vil føre til en ytterligere nedbryting av proteinet i gjødsla. Dette medfører at svært lite Cry-proteiner blir spredt med husdyrgjødsel på dyrket mark, noe som igjen minimerer faren for eksponering av potensielt sensitive ikke-målorganismer. Spredning av Cry-toksinet via gjødsel antas derfor ikke å gi signifikante miljøeffekter.

5.5. Potensiale for samspill med abiotisk miljø og eventuelle effekter på bio-geokjemiske prosesser

Ved foreskrevet bruk av maishybride Bt11 x MIR604 x GA21 vil eksponeringsnivået av Cry-, PAT- og mEPSPS-proteinene være svært lavt, og ikke medføre signifikante effekter på abiotisk miljø og biokjemiske prosesser i Norge.

5.6. Overvåking

I følge direktiv 2001/18/EF, annekset VII er formålet med overvåkingsplanen å bekrefte at alle antagelser i miljørisikovurderingen som gjelder forekomst og omfang av potensielle skadevirkninger av den genmodifiserte organismen, eller bruken av den er korrekt. Videre skal den identifisere forekomsten av skadevirkninger på menneskers helse eller miljøet som skyldes den genmodifiserte organismen eller bruken av den, og som ikke ble forutsett i miljørisikovurderingen.

Overvåking er relatert til risikohåndtering, og en totalvurdering av overvåkingsplanen er derfor utenfor VKMs mandat. I henhold til oppdrag fra DN skal imidlertid VKM diskutere behovet for særskilt overvåking. Dette gjelder både i de tilfeller hvor søker ikke har foreslått særskilt overvåking og i de tilfeller hvor søkers risikovurdering avdekker behov for en spesiell overvåkingsplan. I sistnevnte tilfelle skal VKM gi en vurdering av kvaliteten på søkers overvåkingsplan, om denne er egnet til å avdekke så vel umiddelbare og direkte virkninger som forsinkede og indirekte virkninger påvist i miljørisikovurderingen. VKM skal ikke vurdere innretningen av den generelle overvåkingen.

Søknad EFSA/GMO/UK/2008/56 omfatter ikke dyrking, og potensiell miljøeksponering av den transgene maislinjen er derfor avgrenset til mulige effekter av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport og prosessering til mat, fôr og industrielle formål. I tillegg vil indirekte eksponering gjennom gjødsel fra husdyr fôret med genmodifisert mais representere en mulig kilde til uønsket genspredning. Miljørisikovurderingen som er presentert av søker identifiserer ingen endret risiko for miljø i

forhold til annen mais. Syngenta har derfor ikke utarbeidet spesifikke strategier for risikohandtering eller en særskilt plan for overvåking av Bt11 x MIR604 x GA21.

Tatt i betraktning tiltenkt bruksområde for Bt11 x MIR604 x GA21 anser Faggruppe for GMO at det ikke er behov for å iverksette særskilt program for overvåking av maislinjen.

5.7. Delkonklusjon

Søknaden gjelder godkjenning av maishybriden Bt11 x MIR604 x GA21 for import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer, og omfatter ikke dyrking. Med bakgrunn i tiltenkt bruksområde er miljørisikovurderingen avgrenset til mulige effekter av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport og prosessering, samt indirekte eksponering gjennom gjødsel fra husdyr føret med genmodifisert mais.

Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av maishybriden i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Risiko for utkryssing med dyrkede sorter vurderes til å være ubetydelig. Ved foreskrevne bruk av maishybriden Bt11 x MIR604 x GA21 antas det ikke å være risiko for negative effekter på målorganismer, ikke-målorganismer eller på abiotisk miljø i Norge.

6. Vurdering av søkers dokumentasjon

Søkers dokumentasjon vurderes som tilstrekkelig til å foreta en risikovurdering innenfor områdene som omfattes av de internasjonale retningslinjene. Adjuvans er ikke en del av internasjonale retningslinjer for risikovurdering av mattrygghet. Forskningsfeltet på adjuvans i mat er generelt lite eller ubetydelig. Adjuvanseffekt er tidligere ikke trukket inn i risikovurdering av mat, men på bakgrunn av det økte fokus på matallergi som problem og den påviste sterke adjuvanseffekten av Cry1Ac på antistoffproduksjon i dyremodeller er denne problemstillingen aktualisert.

KONKLUSJON

Det er funnet statistiske forskjeller i enkeltparametere, men verdiene for de enkelte analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen. Faggruppen anser det for lite trolig at disse forskjellene har noen helsemessig konsekvens og konkluderer med at det ikke er grunn til å anta at den ernæringsmessige kvaliteten til den genmodifiserte maisen Bt11 x MIR604 x GA21 er forskjellig fra umodifisert mais.

Flere studier viser at proteinene PAT, PMI, mEPSPS, Cry1Ab og mCry3A ikke er akutt toksiske. Faggruppen konkluderer med at det er lite sannsynlig at eksponering for disse proteinene i seg selv og i de mengder som tilføres via genmodifisert mais kan medføre akutte forgiftninger.

Syngenta har utført og henviser til studier på broiler fôret med maiskorn fra Bt11 x MIR604 x GA21. Disse studiene viser at det ikke er grunn til å anta at den ernæringsmessige kvaliteten til den genmodifiserte maisen Bt11 x MIR604 x GA21 er forskjellig fra umodifisert mais.

Ingen av proteinene som blir uttrykt som følge av genmodifiseringen har egenskaper som tilsier at de er allergener og faggruppen finner at mat- og fôrprodukter fra Bt11 x MIR604 x GA21 som ikke inneholder Cry-proteiner, eksempelvis oljebaserte produkter, ikke medfører endret risiko for allergenitet i forhold til annen mais. Et flertall av faggruppen finner det ikke sannsynliggjort at Cry1Ab- og mCry3A-proteinene kan ha adjuvanseffekt. Fordi proteinet brytes ned i magesaft og på grunn av forekomsten av andre adjuvanter i mat, vurderer de adjuvansproblemstillingen i forbindelse med mais Bt11 x MIR604 x GA21 å være neglisjerbar. På bakgrunn av studier i mus, som viser at Cry-proteiner kan hemme den toleransen som fordøyelsessystemets slimhinner har mot proteiner, mener et mindretall av faggruppen (A.H. Nerland, A.I. Myhr, T. Bøhn, C. Linnestad, H. Klungland) at muligheten for økt allergifremkallende aktivitet hos Bt11 x MIR604 x GA21 ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes.

Søknaden gjelder godkjenning av maishybriden Bt11 x MIR604 x GA21 for import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige helse- og miljøeffekter knyttet til dyrking av maishybriden. Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av maishybriden i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Risiko for utkryssing med dyrkede sorter vurderes til å være ubetydelig. Ved foreskrevne bruk av Bt11 x MIR604 x GA21 antas det ikke å være risiko for negative effekter på målorganismer, ikke-målorganismer eller på abiotisk miljø i Norge.

Samlet vurdering

Flertallet av medlemmene i Faggruppe for genmodifiserte organismer finner at det er lite trolig at bruk av maishybriden Bt11 x MIR604 x GA21 vil medføre endret risiko for helse og miljø i forhold til annen mais. Et mindretall av faggruppen (A.H. Nerland, T. Bøhn, A.I. Myhr, C. Linnestad, H. Klungland) mener at dersom en ser bort fra adjuvansproblematikken, er det lite trolig at bruk av maishybriden Bt11 x MIR604 x GA21 vil medføre endret risiko for helse og miljø i forhold til annen mais. Medlemmene finner imidlertid at muligheten for økt allergifremkallende aktivitet hos Bt11 x MIR604 x GA21 ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes.

En samlet faggruppe påpeker kunnskapshull knyttet til adjuvans generelt, og om Cry-proteinene i Bt11 x MIR604 x GA21 kan virke som adjuvant.

REFERANSER

- Agbios (2008). Agbios GM Database. Information on GM Approved Products.
<http://www.agbios.com/dbase.php>
- Bensasson, D., Boore, J. L. & Nielsen, K. M. (2004). Genes without frontiers. *Heredity*, **92**, 483-489.
- Berin, M.C. & Schreffler, W.G. (2008). T_H2 adjuvants: Implications for food allergy. *J. Allerg. Clin. Immunol.*, **121**, 1311-1320.
- de Jonge, J. D., Knippels, L.M.J., Ezendam, J., Odink, J. Penninks, A. H. & van Loveren, H. (2007) The importance of dietary control in the development of a peanut allergy model in Brown Norway rats. *Methods*, **41**, 99-111.
- de Vries, J. & Wackernagel, W. (2002). Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **99**, 2094-2099.
- EEC (European Economic Community) (1992). Methods for the determination of toxicity. Part B.26 (sub-chronic oral toxicity test: 90-day repeated oral dose using rodent species) as specified by the European Economic Communities, Directive 92/32/EEC.
- EFSA (2004). Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. *The EFSA Journal*, **48**, 1-18. http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_opinions/384.html
- EFSA (2006). *Guidance document of the scientific panel on genetically organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed*. 100 p.
http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_guidance/660.html
- EHC (1999). *Bacillus thuringiensis*. Environmental Health Criteria Monograph 217, International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, 1999
- EPA (1982). Three-generation reproduction study in rats (modified to a 2-generation study). Microfiche No. OTS 0206655. Document ID 87821-4777.
- EPA-FIFRA (1989). US Environmental Protection Agency, Title 40 CFR, Part 160-Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act (FIFRA); Good Laboratory Practice Standards, Final Rule.
- FAO/WHO (2001). *Evaluation of Allergenicity of Genetically Modified Foods*. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology.
<ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/allergygm.pdf>
- Foss, N., Duranti, M., Magni, C. & Frøkiær, H. (2006). Assessment of Lupin Allergenicity in the Cholera Toxin Model: Induction of IgE Response Depends on the Intrinsic Properties of the Conglutins and Matrix Effects. *Int Arch Allergy Immunol*, **141**, 141-150 (DOI: 10.1159/000094716)
- GEMS/FOOD (2003). GEMS/Food regional diets: regional per capita consumption of raw and semi-processed agricultural commodities / prepared by the Global Environment Monitoring System/Food Contamination Monitoring and Assessment Programme (GEMS/Food). Rev. ed. FAO/WHO 2003, ISBN 92 4 159108 0

- Hallauer, A.R. (2000). Potential for outcrossing and weediness of genetically modified insect protected corn. APHIS-USDA.
- ILSI (2006). International Life sciences Institute Crop Composition Database Version 3.0. URL: <http://www.cropcomposition.org>
- Lid, J. & Lid, D.T. (2005). Norsk flora. Det Norske Samlaget, Oslo. 7. utgave. ISBN: 82-521-6029-8. 1230 S.
- Moreno-Fierros, L., Ruiz-Medina, E.J., Esquivel, R., López-Revilla, R. & Piña-Cruz, S. (2003). Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides in mice. *Scand. J. Immunol.*, **57**, 45-55.
- Netherwood, T., Martín-Orúe, S.M., O'Donnell, A.G., Gockling, S., Graham, J., Mathers, J.C & Gilbert HJ. (2004). Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nature Biotechnology*, **22**, 204-209.
- Nielsen, K.M. (2003). An assessment of factors affecting the likelihood of horizontal transfer of recombinant plant DNA to bacterial recipients in the soil and rhizosphere. *Collection of Biosafety Reviews*, **1**, 96-149.
- Nielsen, K.M., Berdal, K.G., Kruse, H., Sundsfjord, A., Mikalsen, A, Yazdankhah, S & I. Nes. (2005).
- Nielsen, K.M, van Elsas, J.D. & Smalla, K. (2000). Transformation of *Acinetobacter* sp. 13(pFG4deltantpII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Applied Environmental Microbiology*, **66**, 1237-42.
- Nielsen, K. M. & Townsend, J. P. (2004). Monitoring and modeling horizontal gene transfer. *Nature Biotechnology*, **22**, 1110-1114. See also correspondence vol 22, 1349-1350.
- OECD (1987). OECD (408). Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. Guideline 408, adopted 21.09.1998. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD (1997). OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice AND Compliance Monitoring, Number 1. OECD Principles on Good Laboratory Practice (revised 1997) ENV/MC/CHEM(98)17.
- OECD (1998). OECD Guideline for the Testing of Chemicals Section 4: Health Effects, Number 408.
- OECD (2002). Consensus Document on Compositional Consideration for New Varieties of Maize (*Zea Mays*): Key Food and Feed Nutrients, Anti-nutrients and Secondary Plant Metabolites, No. 6, Series on Safety of Novel Foods and Feeds.
- OECD (2003). Consensus Document on the biology of *Zea mays* subsp. *Mays* (Maize). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology (ENV/JM/MONO) No. 27:1-49.
- Pettersen, A. K. Primicero, R., Bøhn, T. & Nielsen, K. M. (2005). Modelling suggest frequency estimates are not informative for predicting the long-term effect of horizontal gene transfer in bacteria. *Environmental Biosafety Research*, **4**, 222-233.
- Prasad, S.S.S.V. & Shethna, Y.I. (1975). Enhancement of immune response by the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **62**, 517-521.

- Rojas-Hernández, S., Rodríguez-Monroy, M.A., López-Revilla, R., Reséndiz-Albor, A.A. & Moreno-Fierros, L. (2004). Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infection and Immunity*, **72**, 4368-4375.
- Schubbert, G.W., Lettmann, C. & Doerfler, W. (1994). Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Molecular & General Genetics*, **242**:495-504.
- Steinrücken H., C. & Amrhein N. (1984). 5- Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of *Klebsiella pneumoniae* 2. Inhibition by glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine]. *Eur. J. Biochem.* **143**: 351-357.
- TemaNord (1998). *Safety Assessment of Novel Food Plants: Chemical Analytical Approaches to the Determination of Substantial Equivalence*. TemaNord 1998:591. ISBN 92-893-0263-1.
- van Wijk, F. & Knippels, L. (2007) Initiating mechanisms of food allergy: Oral tolerance versus allergic sensitization *Biomedicine & Pharmacotherapy* **61**, 8-20
- Vazquez-Padron, R.I., Martinez-Gil, A.F., Ayra-Pardo, C., Gonzalez-Cabrera, J., Prieto-Samsonov, D.L. & de la Riva, G.A. (1998). Biochemical characterization of the third domain from *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. *Biochemistry & Molecular Biology International*, **45**, 1011-20.
- Vazquez, R.I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazan, L., De La Riva, G.A. & Lopez-Revilla, R. (1999). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scandinavian Journal of Immunology*, **49**, 578-84.
- Vazquez-Padron, R.I., Gonzales-Cabrera, J., Garcia-Tovar, C., Neri-Bazan, L., Lopez-Revilla, R., Hernandez, M., Moreno-Fierro, L. & de la Riva, G.A. (2000a). Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. kurstaki HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **271**, 54-8.
- Vazquez-Padron, R.I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazan, L., Martinez-Gil, A.F., de-la-Riva, G.A. & Lopez-Revilla, R. (2000b). Characterization of the mucosal and systemic immune response induced by Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **33**, 147-55.
- VKM (2005a). *Uttalelse om Syngentas genmodifiserte mais MIR604 (EFSA/GMO/UK/2005/11)*. 05/323-endelig. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge. <http://www.vkm.no/eway/default.aspx?pid=0&oid=-2&trg=new&new=-2:16917>
- VKM (2005b). *Report from an Ad Hoc Group appointed by the Norwegian Scientific Panel on Genetically Modified Organisms and Panel on Biological Hazards – An assessment on potentially long-term health effects caused by antibiotic resistance marker genes in genetically modified organisms based on antibiotic usage and resistance patterns in Norway*. Opinion 05/302-1-final. Norwegian Scientific Committee for Food Safety, Oslo, Norway. 62 p.
- VKM (2006). *Uttalelse om Monsantos genmodifiserte mais GA21 (EFSA/GMO/UK/2005/19)*. 06/309-endelig. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge. <http://www.vkm.no/eway/default.aspx?pid=0&oid=-2&trg=new&new=-2:16947>
- VKM (2007). Risikovurdering av genmodifisert åkermais Bt11 fra Syngenta (C/UK/94/M3/1. 05/308-endelig. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.