



Vitenskapskomiteen for mattrygghet  
Norwegian Scientific Committee for Food Safety

---

# Miljørisikovurdering av genmodifisert mais MON89034 til mat, fôr, import og prosessering under EU-forordning 1829/2003/EF (EFSA/GMO/NL/2007/37)

---

Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer i  
Vitenskapskomiteen for mattrygghet

Dato: 19.3.2013

Dok. nr.: 13/312-endelig

ISBN: 978-82-8259-086-0

**VKM Report 2013: 13**



## Bidragstere

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:**

Audun H. Nerland (leder), Åshild Andreassen, Per Brandtzæg, Askild Holck, Olavi Junttila, Heidi Sjursen Konestabo, Richard Meadow, Kåre M. Nielsen, Hilde-Gunn Hoen-Sorteberg, Rose Vikse

#### **Koordinatorer fra sekretariatet:**

Merethe Aasmo Finne, Ville Erling Sipinen

## Sammendrag

I forbindelse med forberedelse til implementering av EU-forordning 1829/2003 i norsk rett, er Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM) bedt av Direktoratet for naturforvaltning (DN) om å utarbeide endelige miljørisikovurderinger av alle genmodifiserte organismer (GMOer) og avledete produkter som inneholder eller består av GMOer som er godkjent i EU under forordning 1829/2003 eller direktiv 2001/18, og som er godkjent for ett eller flere bruksområder som omfattes av genteknologiloven. DN har bedt VKM om endelige risikovurderinger for de EU-godkjente søknadene hvor VKM ikke har avgitt endelig miljørisikovurdering. I tillegg har DN bedt VKM vurdere hvorvidt det er nødvendig med oppdatering eller annen endring av de endelige miljørisikovurderingene som VKM tidligere har levert.

Den genmodifiserte og insektsresistente maislinjen MON89034 (Unik kode MON-89Ø34-3) fra Monsanto Company ble godkjent til import, videreforedling og bruk som mat og fôr under EU-forordning 1829/2003 i 2009 (søknad EFSA/GMO/NL/2007/37). VKMs faggruppe for genmodifiserte organismer vurderte MON89034 med hensyn på mulig helse- og miljørisiko i forbindelse med EFSAAs offentlige høring av søknaden i 2007 (VKM 2008a). I tillegg har VKM vurdert en søknad om godkjenning av maislinjen til dyrking (EFSA/GMO/BE/2011/90) (VKM 2012). MON89034 inngår også som foreldrelinje i flere maishybrider som tidligere er risikovurdert av VKM (VKM 2008b, 2009a,b, 2010a,b, 2012).

Miljørisikovurderingen er basert på uavhengige vitenskapelige publikasjoner og dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSAAs nettside EFSA GMO Extranet. Vurderingen er gjort i henhold til tiltenkt bruk i EU/EØS-området, og i overensstemmelse med kravene i genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven. Videre er kravene i EU-forordning 1829/2003/EF, utsettingsdirektiv 2001/18/EF (vedlegg 2,3 og 3B) og veiledende notat til Annex II (2002/623/EF), samt prinsippene i EFSAAs retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter og avledete næringsmidler (EFSA 2006, 2010, 2011).

Den vitenskapelige vurderingen omfatter transformeringsprosess og vektorkonstruksjon, karakterisering og nedarving av genkonstruksjonen, komparativ analyse av agronomiske og fenotypiske egenskaper, potensiale for utilsiktede effekter på fitness, genoverføring og effekter på ikke-målorganismer vurdert.

Det presiseres at VKMs mandat ikke omfatter vurderinger av etikk, bærekraft og samfunnsnytte, i henhold til kravene i den norske genteknologiloven og dens konsekvensutredningsforskrift. Disse aspektene blir derfor ikke vurdert av Faggruppe for genmodifiserte organismer.

Den genmodifiserte maislinjen MON89034 er fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformasjon av umodne maisceller fra en av Monsanto's innavlede maislinjer. MON 89034-plantene har fått satt inn et rekombinant DNA-fragment med to genekspressjonskassetter, inneholdende genene *cry1A.105* og *cry2Ab2*. *Cry1A.105* er et syntetisk gen, som er sammensatt av sekvenser fra genene *cry1Ac*, *cry1Ab* og *cry1F* fra *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Cry2Ab*-genet stammer fra *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Cry1A.105*- og *cry2Ab2*-genene koder for  $\delta$ -endotoksiner, som gir plantene resistens mot enkelte arter i ordenen Lepidoptera.

### Molekylær karakterisering

Faggruppen vurderer karakteriseringen av det rekombinante DNA-innskuddet i maislinje MON89034, og de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av proteinene til å være tilfredsstillende. Faggruppen har ikke identifisert noen risiko knyttet til det som framkommer av den molekylærbiologiske karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i MON89034. Faggruppen har

tidligere vurdert de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av proteinene og funnet at informasjonen er tilstrekkelig (VKM 2008a, 2012).

### **Komparative analyser**

Feltforsøk i USA og Europa viser små eller ingen signifikante forskjeller mellom den transgene maishybriden MON89034 og en korresponderende, nær-isogen kontrollinje med hensyn til morfologiske og agronomiske karakterer. Resultatene indikerer agronomisk og fenotypisk ekvivalens mellom MON89034 og umodifisert kontroll, og at de innsatte genene i MON89034 ikke har medført utilsiktede endringer i egenskaper knyttet til vekst og utvikling hos maisplantene.

### **Miljørisiko**

Søknaden gjelder godkjenning av maislinjen MON89034 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 fôret med genmodifisert mais.

Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av maislinjen 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 foreskrevet bruk av maislinjen MON89034 antas det ikke å være risiko for negative effekter på målorganismer, ikke-målorganismer eller på abiotisk miljø i Norge.

### **Samlet vurdering**

VKMs faggruppe for genmodifiserte organismer finner det lite trolig at den omsøkte bruken av maislinje MON89034 vil medføre endret risiko for miljø sammenlignet med annen mais.

## **Nøkkelord**

Mais, *Zea mays* L., genmodifiserte maishybrid MON89034, EFSA/GMO/UK/2007/37, insektresistens, *cry1A.105*, *cry2Ab2*, miljørisiko, forordning 1829/2003/EF, direktiv 2001/18/EF

## Forkortelser og ordforklaringer

Allel	Et bestemt gen kan foreligge i ulike varianter (alleler). Allelene kan være dominante (bestemmende for fenotypen) eller recessive (vikende).
ALS	Acetolactatsyntase-enzym
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.
	BC <sub>1</sub> , BC <sub>2</sub> etc: betegnelse på 1. og 2. tilbakekryssingsgenerasjon, etc.
BLASTn	Algoritme som benyttes for homologisammenligning av nukleotidsekvenser.
BLASTP	Algoritme som benyttes for homologisammenligning av aminosyresekvenser i proteiner.
BLASTx	Algoritme som benyttes for oversetting fra kodende nukleotidsekvenser til aminosyresekvenser.
bp	Basepar
<i>B.t.</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Codex	FAO/WHO-organ som etablerer globale handelsstandarder for mat.
Cry	Krystallprotein fra jordbakterien <i>Bacillus thuringiensis</i>
Cry1A.105	Et kimært protein, bestående av domener fra proteinene Cry1Ab, Cry1F og Cry1Ac som gir maisplantene resistens mot angrep fra insektlarver fra arter i ordenen Lepidoptera
Cry2Ab2	Et Cry2-klasse krystallprotein fra <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>
DG JRC-EURL	Directorate-General Joint Research Centre - European Union Reference Laboratory
DN	Direktoratet for naturforvaltning
DNA	Deoxyribonukleinsyre (DNA)
Dominant allel	Et allel som uttrykker samme fenotype, uavhengig av om allelene i genparet er like (homozygot) eller ulike (heterozygote).
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FAO	Food and Agriculture Organization, FN's organisasjon for ernæring og landbruk.
FIFRA	US EPA Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act. USAs føderale lov om insektdrepende midler, soppdrepende midler og midler mot skadedyr.
Fitness	Et individs relative evne til å føre sine gener/alleler videre til kommende generasjoner.
GLP	Good Laboratory Practices, retningslinjer for godt laboratoriearbeid.
GMO	Genmodifisert organisme
GMP	Genmodifisert plante
HGT	Horisontal genoverføring
Konstitutiv	Cellulær produksjon av et molekyl med konstant hastighet og som ikke reguleres av indre og ytre stimuli.
Konstitutivt gen	Et gen hvis aktivitet bare avhenger av hvordan promoteren til genet binder RNA polymerase.
Lokus	Spesifikk posisjon på kromosomet der et gen er lokalisert.
MALDITOF	Massespektrometrimetode for å måle molekylvekt til peptider.
Mendelsk nedarving	Lovmessig nedarvingsmønster ved ulike typer kryssinger.
MT	Mattilsynet
Northern blot	Teknikk for overføring av RNA til en membran for påvisning av uttrykte RNA-sekvenser.

Nær-isogen linje	Linjer eller sorter som er genetisk identiske, med unntak av ett lokus eller kromosomsegment.
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
ORF	Open Reading Frame (åpen leseramme)
OSWP	Overseason whole plant
PAT	Phosphinothricin Acetyl-transferase protein
PCR	Polymerase chain reaction. Polymerase kjedereaksjon. Metode for å syntetisere et stort antall kopier av en DNA-sekvens vha primere.
RNA	Ribonukleinsyre
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat (SDS)-polyakrylamidelektroforese. Elektroforesemetode 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 som er i jordbakterien <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Ti-plasmidet (Transfer-DNA) overføres fra bakterien, og settes inn i plantecellenes kjernegenom. T-DNAet som overføres avgrenses av V (venstre) og H (høyre) flankesekvenser, og begrenser derfor den delen av Ti-plasmidet som overføres og gjør at resten av vektoren ikke blir satt inn i plantekromosomene.
USDA	United States Department of Agriculture
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
Western-blot	Metode for overføring av proteiner til en membran som binder protein.
WHO	World Health Organisation. Verdens helseorganisasjon, organ under FN

# Innholdsfortegnelse

<b>Bidragsytere</b> .....	<b>1</b>
<b>Sammendrag</b> .....	<b>3</b>
<b>Nøkkelord</b> .....	<b>4</b>
<b>Forkortelser og ordforklaringer</b> .....	<b>5</b>
<b>Innholdsfortegnelse</b> .....	<b>7</b>
<b>Bakgrunn</b> .....	<b>8</b>
<b>Oppdrag fra Direktoratet for naturforvaltning</b> .....	<b>9</b>
<b>Risikovurdering</b> .....	<b>10</b>
<b>1 Innledning</b> .....	<b>10</b>
1.1 Beskrivelse av egenskaper og virkningsmekanismer .....	10
<b>2 Molekylær karakterisering</b> .....	<b>10</b>
2.1 Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon .....	10
2.2 Karakterisering av geninnsettingen/genkonstruksjonen.....	11
2.3 Informasjon vedrørende uttrykk av innsatte gener og åpne leserammer (ORF) .....	15
2.4 Nedarving og stabilitet av innsatt DNA .....	18
2.5 Delkonklusjon.....	18
<b>3 Komparative analyser</b> .....	<b>19</b>
3.1. Agronomiske karakterer.....	19
3.2 Delkonklusjon.....	19
<b>4 Miljørisikovurdering</b> .....	<b>20</b>
4.1 Potensiale for utilsiktede effekter på fitness relatert til genmodifiseringen .....	20
4.2 Potensiale for genoverføring .....	20
4.2.1 Horisontal genoverføring (HGT) .....	21
4.2.2 Vertikal genoverføring.....	21
4.3 Potensiale for samspill mellom GMP og målorganismer.....	22
4.4 Potensiale for samspill mellom GMP og ikke-målorganismer.....	22
4.5 Delkonklusjon.....	22
<b>5 Overvåking</b> .....	<b>23</b>
<b>Konklusjon</b> .....	<b>24</b>
<b>Referanser</b> .....	<b>25</b>
<b>Vedlegg 1</b> .....	<b>28</b>

## Bakgrunn

I forbindelse med forberedelse til implementering av EU-forordning 1829/2003 i norsk rett, er Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM) bedt av Direktoratet for naturforvaltning om å utarbeide endelige miljørisikovurderinger av alle genmodifiserte organismer (GMOer) og avledete produkter som inneholder eller består av GMOer som er godkjent i EU under forordning 1829/2003 eller direktiv 2001/18, og som er godkjent for ett eller flere bruksområder som omfattes av genteknologiloven. DN har bedt VKM om endelige risikovurderinger for de EU-godkjente søknadene hvor VKM ikke har avgitt endelig miljørisikovurdering. I tillegg har DN bedt VKM vurdere hvorvidt det er nødvendig med oppdatering eller annen endring av de endelige miljørisikovurderingene som VKM tidligere har levert.

Den genmodifiserte maishybriden MON 89034 (Unik kode SYN-BTØ11-1 x MON-ØØØ21-9) fra Syngenta Seeds Inc. ble søkt godkjent til import, prosessering, og som mat og fôr under EU-forordning 1829/2003/EF i 2007 (EFSA/GMO/NL/2007/39). Søknaden ble fremmet og anbefalt av nederlandske myndigheter i januar 2007. Dokumentasjonen knyttet til søknaden ble lagt ut på offentlig høring på EFSA's GMO Extranet 24. august 2007, med frist på 90-dager for innspill fra EU- og EØS/EFTA-landene. Under høringen vurderte VKMs faggruppe for GMO søknaden med hensyn på mulig helse- og miljørisiko, og utarbeidet en foreløpig risikovurdering av maishybriden. Risikovurderingen ble publisert 9.5.2008 (VKM 2008a), sammen med faggruppens innspill til EFSA (Vedlegg 1). EFSA's GMO-panel ferdigstilte sin helse- og miljørisikovurdering av maishybriden 3.12.2008 (EFSA 2008), og søknaden godkjent av EU-Kommisjonen 30.10.2009 (Kommisjonsbeslutning 2009/813/EU).

Utenfor EU/EØS-området er MON 89034 godkjent for dyrking i Canada (CERA 2013). I tillegg er maishybriden godkjent til bruk som mat og/eller fôr i Colombia, Japan, Sør-Korea, Mexico og Filippinene.



## Oppdrag fra Direktoratet for naturforvaltning

I forbindelse med forberedelse til implementering av EU-forordning 1829/2003 i norsk rett, er Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM), i brev av 13. juni 2012 (ref. 2008/4367/ART-BI-BRH), bedt av Direktoratet for naturforvaltning om å utarbeide endelige miljørisikovurderinger av alle genmodifiserte organismer (GMOer) og avledete produkter som inneholder eller består av GMOer som er godkjent i EU under forordning 1829/2003 eller direktiv 2001/18, og som er godkjent for ett eller flere bruksområder som omfattes av genteknologiloven. DN har bedt VKM om endelige risikovurderinger for de EU-godkjente søknader hvor VKM ikke har avgitt endelig miljørisikovurdering. I tillegg har DN bedt VKM vurdere hvorvidt det er nødvendig med oppdatering eller annen endring av de endelige miljørisikovurderingene som VKM tidligere har levert

Grunnlaget for vurdering av søkers miljørisikovurdering er nedfelt i lov om framstilling og bruk av genmodifiserte organismer (genteknologiloven), forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven, EUs utsetningsdirektiv 2001/18/EF, veiledende notat til Annex II til direktiv 2001/18 (2002/623/EC) og EU-forordning 1829/2003. Videre vil EFSA's veiledningsdokumenter for risikovurdering av genmodifiserte planter og avledete produkter (EFSA 2006, 2010, 2011), og OECDs veiledningsdokumenter være nyttige i forbindelse med utarbeidelse av norske risikovurderinger.

I henhold til oppdraget skal vurderingen primært fokusere på risiko for miljø i Norge, og skal omfatte produktets potensielle miljørisiko ved eventuelle endringer i landbrukspraksis. Oppdraget omfatter både direkte miljøeffekter av bruk av tiltenkt plantevernmiddel i den genmodifiserte kulturen under norske forhold, og miljørisiko som følge av endret agronomi og mulige langsiktige endringer i bruksmønster av plantevernmidler.

# Risikovurdering

## 1 Innledning

Miljøriskovurderingen av den genmodifiserte maishybriden MON89034 er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSA's nettside EFSA GMO Extranet. I tillegg er det benyttet uavhengige vitenskapelige publikasjoner med referee i vurderingen. MON89034 er risikovurdert i henhold til tiltenkt bruk i EU/EØS-området, og i overensstemmelse med miljø- og helsekravene i matloven og genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven. Videre er kravene i EUs forordning 1829/2003/EF og utsetningsdirektiv 2001/18/EF med annekser, lagt til grunn for vurderingen.

Faggruppen har vedtatt å benytte EFSA's retningslinjer som retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter. Prinsippene som er lagt til grunn for vurderingen er derfor hentet fra EFSA's veiledningsdokumenter for risikovurdering av genmodifiserte planter og avledete næringsmidler og fôrvarer (EFSA 2006, 2010, 2011).

### 1.1 Beskrivelse av egenskaper og virkningsmekanismer

MON 89034 er fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformasjon av umodne maisceller fra en av Monsanto's innavlede maislinjer. MON 89034-plantene har fått satt inn et rekombinant DNA-fragment med to genekspresjonskassetter, inneholdende genene *cry1A.105* og *cry2Ab2*. *Cry1A.105* er et syntetisk gen, som er sammensatt av sekvenser fra genene *cry1Ac*, *cry1Ab* og *cry1F* fra *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Cry2Ab*-genet stammer fra *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Cry1A.105*- og *cry2Ab2*-genene koder for  $\delta$ -endotoksiner som gir plantene toleranse mot enkelte arter i ordenen Lepidoptera, eksempelvis maispyralide (*Ostrinia nubilalis*), "Mediterranean corn borer" (*Sesamia nonagroides*), "fall armyworm" (*Spodoptera frugiperda*), stort jordfly (*Agrotis ipsilon*), og "corn earworm" (*Helicoverpa zea*).

## 2 Molekylær karakterisering

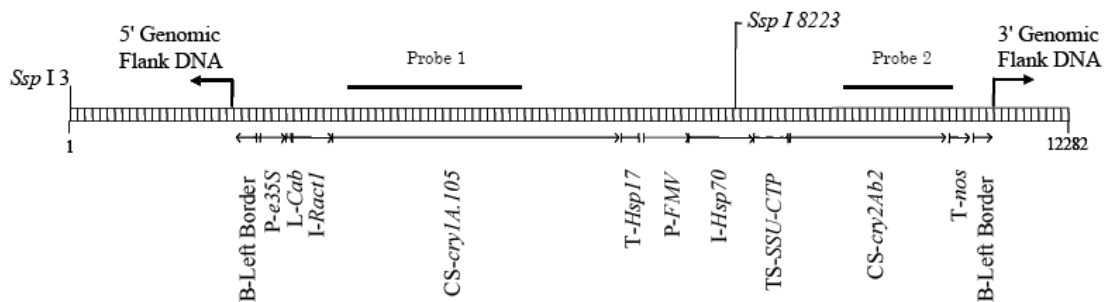
### 2.1 Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

I henhold til søkers dokumentasjon er det benyttet *Agrobacterium*-mediert transformering til produksjon av den transgene maislinjen MON 89034. Plasmidet PV-ZMIR245, som inneholder to rekombinante DNA-fragmenter, ble benyttet til transformasjon av umodne celler fra en av Monsanto's umodifiserte, innavlede foredlingslinjer. Begge de rekombinante DNA-fragmentene (T-DNA I og T-DNA II) ble satt inn i maisgenomet. T-DNA I inneholder en *cry1A.105*- og en *cry2Ab2*-ekspresjonskasset, mens T-DNA II inneholder en *nptII*-ekspresjonskasset. Transformanter ble selektert ved at de overlevde og vokste i nærvær av paromomycin. Påfølgende innavl på F1-generasjonen førte til at T-DNA I (*cry1A.105/cry2Ab2*-kassetten) ble segregert fra T-DNA II (*nptII*-kassetten). MON 89034-plantene inneholder bare rekombinant DNA-fragment som inneholder *cry1A.105*- og *cry2Ab2*-genkassetten (T-DNA I), mens planter som inneholder *nptII*-kassetten (T-DNA II) ble eliminert.

## 2.2 Karakterisering av geninnsettingen/genkonstruksjonen

Ekspresjonskassetten som koder for Cry1A.105-protein består av promoteren *P-e35S* med et forsterkerelement, ledesequens fra blomkålmosaikkvirus (*CaMV*) 35S RNA, 5' ikke-translatert ledesequens fra hveteklorofyll a/b/ bindingsprotein (*L-Cab*) og et intron fra risaktingenet (*I-Ract1*) (tabell 1). Videre inneholder ekspresjonskassetten *cry1A.105*-sekvenser, som er optimalisert for ekspresjon i enfrøbladet planter, og 3' ikke-translatert sekvens fra hvete "heat shock"-protein 17.3 (*T-Hsp17*). En 3' ikke-translatert sekvens fra hvete avslutter transkripsjonen. *Cry2Ab2* ekspresjonskassetten uttrykker *Cry2Ab2*-proteinet. Ekspresjonskassetten består av 35S promoter fra brunrotmosaikkvirus (*P-FMV*), første intron (*I-Hsp70*) fra maisgenet *Hsp 70* og *cry2Ab2*-genekvens med et modifisert kodon *CS-cry2Ab2*. *CS-cry2Ab2* er satt sammen med et kloroplastoverføringspeptid (*TS-SSU-CTP*). *TS-SSU-CTP* er sammensatt av "small subunit" fra maisgenet *ribulose 1,5-difosfat karboksylase* og genets første intron, samt sekvensen *T-nos* fra nopalinsyntasegenet (*nos*). *Nos*-genet stammer fra bakterien *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA og *T-nos* avslutter (terminerer) transkripsjonen (uttrykkes ikke i planten). DNA-fragmentet inneholder ikke antibiotikaresistensgener.

Southern blot og sekvensering er benyttet for å karakterisere det rekombinante DNA-fragmentet i planten. Molekylærbiologisk karakterisering viser at det er satt inn en enkelt kopi av DNA-fragmentet i maisens genom. Dette fragmentet inneholder følgende gener og DNA elementer (figur 1, tabell 1 & 2).



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

Tabell 1. Beskrivelse og størrelsesfordeling av gener og regulatoriske elementer i DNA-fragmentet.

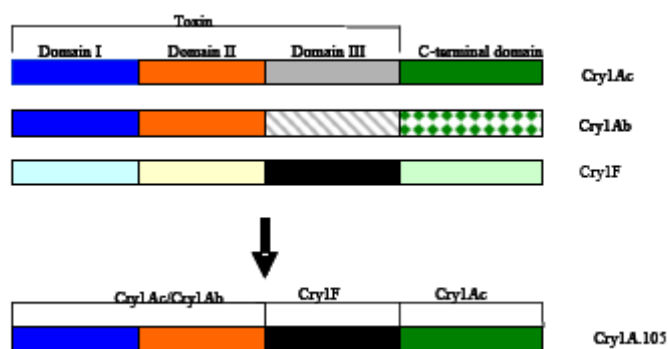
Genetisk element	Funksjon
<i>Cry1A.105-ekspressjonskassett</i>	
<i>P-e35S</i>	Promoter og 9 bp ledesequens fra blomkål mosaikkvirus (CaMV) 35S RNA
<i>L-Cab</i>	5' ledesequens hvete klorofyll a/b/ bindingsprotein, uttrykkes ikke i planten
<i>ract1 intron</i>	Intron fra risaktin- genen
<i>CS-cry1A.105</i>	Syntetisk gen med sekvenser fra genene <i>cry1Ab</i> , <i>cry1Ac</i> og <i>cry1F</i> , genene stammer av <i>Bacillus thuringiensis</i> , se figur 2
<i>T-Hsp17</i>	3' DNA sekvens som avslutter transkripsjonen, kommer fra hvete "heat shock" protein 17.3, uttrykkes ikke i planten
<i>Cry2Ab2-ekspressjonskassett</i>	
<i>P-FMV</i>	35S promoter fra brunrotmosaikkvirus
<i>I-Hsp 70</i>	Første intronet fra mais "heat shock" protein-70 genen
TS-SSU-CTP	Kloroplastoverføringspeptid fra mais ribulose 1,5-difosfat karboksylase "small subunit," inkludert det første intronet.
<i>cry2Ab2</i>	Gen som koder et syntetisk Cry2Ab2-protein, fra <i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>T-nos</i>	3' DNA sekvens som avslutter transkripsjonen, kommer fra nopaline syntase ( <i>nos</i> )-genet fra <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Uttrykkes ikke i planten.

Den genmodifiserte maislinjen MON 89034 uttrykker insektsresistens. Bakgrunnen for insektsresistensen er at planten uttrykker bakterieproteinene Cry2Ab2, samt en variant av Cry1A-proteinene (Cry1A.105). Cry1A.105- og Cry2Ab2-proteinene, som uttrykkes av *cry1A.105* og *cry2Ab2* genene, er toksiner som gir planten resistens mot larver i sommerfuglordenen *Lepidoptera*. Cry1A.105-proteinene er et kimært protein som består av domene I og II fra Cry1Ac eller Cry1Ab, domene III fra Cry1F, og C-terminal domene fra Cry1Ac. Cry1Ab- og Cry1Ac-proteinene har 100 % aminosyresekvensidentitet med domene I og II, se figur 2. Cry1A.105-proteinets aminosyresekvensidentitet til Cry1Ac-, Cry1Ab-, og Cry1F- proteinene er henholdsvis 93,6 %, 90,0 %, og 76,7 %. Basesequensene i *cry2Ab2*-genet og det syntetiske *cry1A.105*-genet stammer fra jordbakterien *Bacillus thuringiensis*.

Tabell 2. Størrelsesfordeling av gener og regulatoriske elementer i MON 89034.

Genetic Element	Size (~kb)	Function (Reference)
<b>B-Left Border<sup>r1</sup></b>	0.24	239bp DNA region from the B-left Border region remaining after integration.
<b>P-<i>e35S</i><sup>sp</sup></b>	0.30	Modified <i>e35s</i> promoter and 9 bp leader resulting from a recombination between the P- <i>e35s</i> and P- <i>35s</i> promoters. Differing from <i>e35S</i> in that it does not contain the duplicated enhancer element
<b>L-<i>Cab</i></b>	0.06	5' untranslated leader of the wheat chlorophyll a/b-binding protein (Lamppa <i>et al.</i> , 1985)
<b>I-<i>Ract1</i></b>	0.48	Intron from the rice actin gene (McElroy <i>et al.</i> , 1991)
<b>CS-<i>cry1A.105</i></b>	3.53	Coding sequence for the <i>Bacillus thuringiensis</i> Cry1A.105 protein (Monsanto unpublished data)
<b>T-<i>Hsp17</i></b>	0.21	3' nontranslated region of the coding sequence for wheat heat shock protein 17.3, which ends transcription and directs polyadenylation (McElwain and Spiker, 1989)
<b>P-<i>FMV</i></b>	0.56	Figwort Mosaic Virus 35S promoter (Rogers, 2000)
<b>I-<i>Hsp70</i></b>	0.80	The first intron from the maize heat shock protein 70 gene (Brown and Santino, 1995)
<b>TS-<i>SSU-CTP</i></b>	0.40	DNA region containing the targeting sequence for the transit peptide region of maize ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit and the first intron (Matsuoka <i>et al.</i> , 1987)
<b>CS-<i>cry2Ab2</i></b>	1.91	Coding sequence for a Cry2Ab2 protein from <i>Bacillus thuringiensis</i> (Donovan, 1991; Widner and Whiteley, 1989). This coding sequence uses a modified codon usage
<b>T-<i>nos</i></b>	0.25	3' termination sequence of the nopaline synthase ( <i>nos</i> ) coding sequence from <i>Agrobacterium tumefaciens</i> which terminates transcription and directs polyadenylation (Bevan <i>et al.</i> , 1983)
<b>B-Left Border<sup>r2</sup></b>	0.23	230 bp DNA region from the B-Left Border region remaining after integration

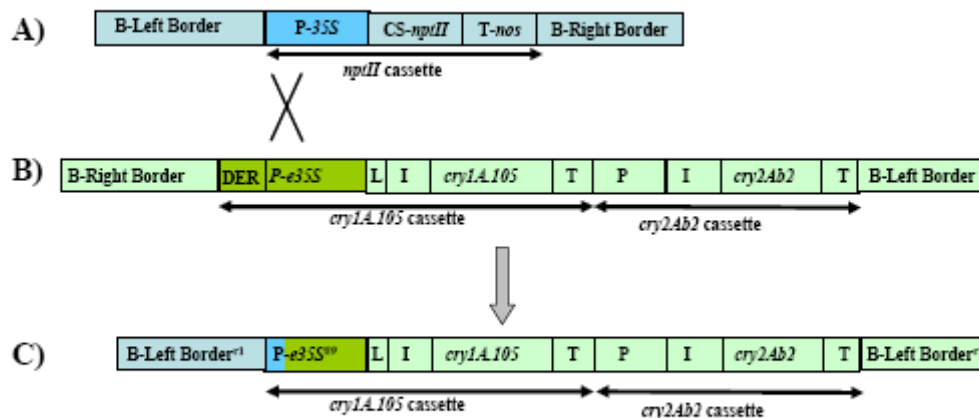
B – Border region  
P – Promoter  
L – Leader  
I – Intron  
CS – Coding sequence  
T – Transcript termination sequence  
TS – Targeting sequence



Figur 2. Skjematisk tegning over domenene i cry1A.105 og deres likhet til tilsvarende domener i cry1Ab, cry1Ac og cry1F.

Molekylærbiologiske analyser viser at det rekombinante fragmentet i planten inneholder de samme gener og genelementer som er på det tilsvarende T-DNA I-fragmentet i plasmidet PV-ZMIR245. Både Cry1A.105- og Cry2Ab2-proteinet som uttrykkes i maisplanten er undersøkt med Western-blot analyse og densitometri, SDS-PAGE og densitometri, trypsinbehandling av proteinene og peptidkartlegging med MALDITOF massespektrometri, Southern blot, analyse av N-enden til proteinet, samt glykosyleringsanalyse. Proteinene er undersøkt for bioaktivitet. Bioaktivitet-assayene viser at rensset planteprodusert Cry1A.105 og *E. coli*-produisert Cry1A.105-protein har en veksthemmende aktivitet (EC50) på målorganismen på henholdsvis  $0,0074 \pm 0,0017 \mu\text{g Cry1A.105/ml}$  diett (variasjonsbredde (vb) = 0,0055 - 0,0089) og  $0,0120 \pm 0,0062 \mu\text{g Cry1A.105/ml}$  diett (vb = 0,0053 - 0,0170). For Cry2Ab2 er tilsvarende EC50-verdier henholdsvis  $0,16 \pm 0,01 \mu\text{g Cry2Ab2/ml}$  diett (vb = 0,16 - 0,17) og  $0,16 \pm 0,04 \mu\text{g Cry2Ab2/ml}$  diett (vb = 0,13 - 0,20). Analysene viser at Cry1A.105- og Cry2Ab2- proteinene er strukturelt og funksjonelt like de *E. coli*-produserte proteinene. Det ble ikke påvist glykoliserings seter på proteinene.

Flankerende sekvenser, ca. 200 bp oppstrøms (5'-enden til genet) og ca 200 bp nedstrøms (3'-enden til genet) er sekvensert. Sekvensanalyser av det rekombinante DNA-fragmentet på 9317 bp i MON 89034 viser at flankesekvensene til fragmentet er genomisk DNA fra mais. I den genomiske 5'-enden er det påvist et innskudd på 10 bp, mens det i 3'enden er påvist en delesjon på 57 bp i MON 89034 i forhold til umodifisert mais. Sekvensanalyser viser at både *cry1A.105* og *cry2Ab2* DNA-sekvensene er identiske med de korresponderende sekvensene på plasmidet PV-ZMIR245. Sekvenseringsdata viser også at *e35S*-promoteren som regulerer ekspresjonen av *cry1A.105* er en kortere versjon ved at det ikke inneholder det dupliserte forsterkerelementet. Høyre grense, dvs 5'-enden, til T-DNA I-fragmentet i plasmidet PV-ZMIR245 er fjernet ved innsetningen og erstattet med en forkortet versjon av venstre grense (figur 3). T-DNA II elementer, som *npII*-genet og unike T-DNA II DNA sekvenser, ble ikke påvist i MON 89034 ved bruk av Southern-blot.



Figur 3. Beskrivelse av rekombinasjonsprosessen som viser modifiseringen i 5'-enden av innskuddet.

## 2.3 Informasjon vedrørende uttrykk av innsatte gener og åpne leserammer (ORF)

### Proteinuttrykk

#### *Søknad EFSA/GMO/NL/2007/37*

I henhold til søknad EFSA/GMO/NL/2007/37 er konsentrasjonen av Cry1A.105- og Cry2Ab2-protein er målt i prøver fra MON 89034 dyrket i felt i representative områder for maisdyrking i Argentina og USA. I henhold til dokumentasjonen fra søker er det gjennomført henholdsvis 5 feltforsøk i Argentina i 2004 og 5 feltforsøk i USA vekstsesongen 2005. Ekspresjonen av Cry1A.105- og Cry2Ab2-proteinene ble målt ved hjelp av enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) i ulike plantevev og på forskjellige vekststadier. Det ble tatt prøver av blad, rot, hel plante, pollen, hunnblomster, fôrfraksjon, frø og stilk/blad (rester etter høsting).

Analyse av samtlige forsøk viste at konsentrasjonen av Cry1A.105 varierte mellom 27-850 µg/g tørrvekt (t.v.) i blad, 6,2-36 µg/g t.v. i rot, 23-570 µg/g t.v. i hel plante, 6,1-16 µg/g t.v. i pollen, 1,9-7 µg/g t.v. i frø, 19-56 µg/g t.v. i fôr og 11-85 µg/g t.v. i restfraksjon. Resultatene fra USA viste gjennomsnittlige konsentrasjoner av Cry1A.105 på henholdsvis 5,9 µg/g t.v. i frø, 520 µg/g t.v. i unge blad, 42 µg/g t.v. i fôr, 12 µg/g t.v. i pollen, 12 µg/g t.v. i rot og 50 µg/g t.v. i restfraksjon. Tilsvarende viste de nordamerikanske forsøkene gjennomsnittlige nivåer av Cry2Ab2-protein på 1,3 µg/g t.v. i frø, 180 µg/g t.v. i unge blad, 38 µg/g t.v. i fôr, 0,64 µg/g t.v. i pollen, 21 µg/g t.v. i rot og 62 µg/g t.v. i restdelen.

#### *Søknad EFSA/GMO/NL/2009/72*

I vedlagte søknad som omfatter hybrid MON89034 x NK603 presenterer Monsanto resultater fra en proteinekspresjonsstudie i Europa vekstsesongen 2007. Forsøkene ble lagt ut på henholdsvis tre og fire lokaliteter i representative områder for maisdyrking i Tyskland og Spania. Forsøkene inkluderte foruten testlinjen, foreldrelinjene MON89034 og NK603, samt en ikke-transgen kontrollinje. Det ble tatt prøver av pollen, hunnblomster (arr), korn, blad, hel plante og rotvev på ulike tidspunkt gjennom vekstsesongen.

Det ble tatt prøver for analyse av blad, rotvev og hel plante fire ganger i løpet av vekstsesongen, tilsvarende vekststadium V2-V4, V6-V8, V10-V12 og preVT. Prøver av pollen og hunnblomster ble tatt ved pollenspredning (R1) og korn ved fysiologisk modning (R6). I tillegg ble det tatt prøver av fôrfraksjon ved høsting som fôrmais (R5) og stengel/blad etter høsting av kolber. For nærmere beskrivelse av vegetative og reproduktive utviklingsstadier hos mais, se forkortelser og ordforklaringer.

Nivåene av Cry-proteiner og CP4 EPSPS i ulike plantevev og utviklingsstadier er vist i tabell 5. I gjennomsnitt over forsøkssteder var nivået av Cry1A.105-protein i blad, røtter og hel plante henholdsvis 120, 46 og 140 µg/g tørrvekt (t.v.) på vekststadium V2-V4. Gjennom vekstsesongen varierte konsentrasjonen av proteinet mellom 53 – 150 µg/g t.v. i blad, 21-46 µg/g t.v. i røtter og 56-140 µg/g t.v. i hel plante. I fôrfraksjon, stilk, hunnblomster, pollen og korn ble det gjennomsnittlige nivået av Cry1A.105 målt til henholdsvis 34, 15, 16, 8,2 og 3,1 µg/g t.v.

Uttrykket av Cry2Ab2 i MON 89034 x NK603 ble tilsvarende målt til 190 µg/g t.v. i blad, 32 µg/g t.v. i rot og 200 µg/g t.v. i hel plante. Konsentrasjonen av proteinet blad og hel plante ble redusert utover vekstsesongen, mens nivået i rotvev var relativt konstant. I fôrfraksjon, stilk, hunnblomster, pollen og korn ble det gjennomsnittlige nivået av Cry2Ab2 målt til henholdsvis 40, 38, 24, 0,75 og 1,9 µg/g t.v.

Tilsvarende ble nivåene av CP4 EPSPS målt til 440, 75 og 220 µg/g t.v. i henholdsvis blad, rotvev og hel plante i vekststadium V2-V4. Gjennom vekstsesongen varierte de gjennomsnittlige konsentrasjonene av proteinet mellom 160 – 440 µg/g t.v. i blad, 42-75 µg/g t.v. i røtter og 170-220 µg/g t.v. i hel plante. I fôrfraksjon, stilk, pollen og korn ble det gjennomsnittlige nivået av CP4 EPSPS målt til henholdsvis 45, 27, 160 og 3,8 µg/g t.v.

#### **Åpne leserammer**

Teoretiske analyser av mulige polypeptider fra hver leseramme v.h.a. allergen (AD6)-, toksin (TOXIN5)- og peptid (ALLPEPTIDES)-databaser viser ingen strukturelle likheter til allergener, toksiner og farmakologiske aktive proteiner. 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 reaksjoner.



**Tabell 3. Gjennomsnittlige konsentrasjoner av Cry1A.105-, Cry2Ab2-, og CP4 EPSPS-proteiner ( $\mu\text{g/g}$  t.v.) målt i ulike plantevev av MON 89034 x NK603, og respektive foreldrelinjer. Fra feltforsøk i Europa vekstsesongen 2007.**

Protein	Maislinje	Blad	Rot	Hel plante	Fôr	Hunn- blomster	Pollen	Korn
		Gj.kons. (var.omr.)	Gj.kons. (var.omr.)	Gj.kons. (var.omr.)	Gj.kons. (var.omr.)	Gj.kons. (var.omr.)	Gj.kons. (var.omr.)	Gj.kons. (var.omr.)
Cry1Ab.105	MON89034	130 (85-240)	44 (27-66)	240 (160-320)	40 (31-53)	13 (4,9-22)	24 (15-30)	3,4 (1,7-5,9)
	MON89034 x NK603	120 (69-250)	46 (30-64)	140 (72-360)	34 (26-49)	16 (4,4-34)	8,2 (4,1-11)	3,1 (1,8-5,1)
Cry2Ab2	MON89034	180 (110-280)	31 (19-58)	110 (77-150)	49 (25-89)	31 (14-59)	0,59 (0,21-1,5)	1,8 (0,58-3,0)
	MON89034 x NK603	190 (83-340)	32 (18-55)	200 (100-290)	40 (25-73)	24 (7,7-95)	0,75 (0,29-2,4)	1,9 (0,74-3,0)
CP4 EPSPS	NK603	370 (270-460)	89 (48-160)	230 (120-340)	62 (31-150)	-	250 (95-450)	5,3 (1,8-10)
	MON89034 x NK603	440 (260-710)	75 (52-110)	220 (140-320)	45 (29-73)	-	160 (94-270)	3,8 (0,78-8,3)

<sup>1</sup> Prøver tatt ved utviklingstrinn V2-V4.

## **2.4 Nedarving og stabilitet av innsatt DNA**

I henhold til søkers dokumentasjon er genetisk stabilitet undersøkt ved analyse av genomisk DNA fra 7 ulike generasjoner med konvensjonelle kryssinger. Resultatene viser at det rekombinante DNA-innskuddet er integrert i genomet og nedarves stabilt over generasjoner. Fenotypisk stabilitet er vist ved spaltingsdata fra 7 kryssingsgenerasjoner og 3 generasjoner med selvbestøving. Segregasjonsanalysene (chi-kvadrat-test) viser forventet spaltningstall for insektsresistens, og det konkluderes med at det rekombinante DNA-fragmentet følger mønsteret for mendelsk nedarving av et enkelt, dominant lokus.

## **2.5 Delkonklusjon**

Faggruppen vurderer karakteriseringen av det rekombinante DNA-innskuddet i maislinje MON89034, og de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av proteinene til å være tilfredsstillende. Faggruppen har ikke identifisert noen risiko knyttet til det som framkommer av den molekylærbiologiske karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i MON89034

Faggruppen har tidligere vurdert de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av proteinene og funnet at informasjonen er tilstrekkelig (VKM 2008a, 2012).

## 3 Komparative analyser

### 3.1. Agronomiske karakterer

Søker opplyser at det er gjennomført feltforsøk med maislinjen MON 89034 på til sammen 18 lokaliteter i USA i 2004 og 2005. Forsøksfeltene ble lagt ut på ulike steder i de to forsøksårene, og det foreligger derfor kun observasjoner fra en vekstsesong for hver lokalitet. En rekke kommersielt tilgjengelige hybridsorter ble benyttet som referansemateriale i forsøkene. I tillegg ble det benyttet ikke-transgene maislinjer med tilsvarende genetisk bakgrunn som kontroll (H1325023, DKC51-43). Det er foretatt registreringer av karakterer knyttet til reproduksjon, spredning, vegetativ vekst, sjukdoms- og insektresistens, samt toleranse mot ulike abiotiske stressfaktorer (tørke, vind, næringsmangel etc.). Resultatene viser signifikante forskjeller ( $p \leq 0,05$ ) mellom MON 89034 og kontrollinjen for karakterene plantehøyde og lengde i 2004-forsøkene. Gjennomsnittsverdiene for disse karakterene ligger imidlertid innenfor variasjonsområdene for referansesortene som er presentert i søknaden. For de øvrige agronomiske og morfologiske egenskapene ble det ikke funnet signifikante forskjeller. Med bakgrunn i manglende registreringer over flere vekstsesonger er alle statistiske analyser foretatt innen år. Det er derfor ikke mulig å vurdere effekt av år eller stabilitet over år for de fenotypiske egenskapene. I tillegg til feltforsøkene er det foretatt spiretester i vekstkamre under ulike temperaturregimer. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom den transgene linjen og kontrollsorter med hensyn på de undersøkte parameterne knyttet til frøkvile og spiring. Undersøkelser av pollendiameter og -vitalitet viste at uttrykk av Cry1A.105- og Cry2Ab2- proteiner ikke har effekt på morfologi og vitalitet av pollen fra MON89034.

I forbindelse med søknad om godkjenning av maislinje MON89034 til dyrking (EFSA/GMO/BR/2011/90) har VKMs faggruppe for GMO gjennomgått data fra europeiske feltforsøk for komparative analyser av agronomiske og fenotypiske karakterer (VKM 2012). Basert på disse resultatene konkluderes det med ekvivalens mellom MON89034 og umodifisert kontroll med hensyn på disse karakterene.

### 3.2 Delkonklusjon

Feltforsøk i USA og Europa viser små eller ingen signifikante forskjeller mellom den transgene maishybriden MON89034 og en korresponderende, nær-isogen kontrollinje med hensyn til morfologiske og agronomiske karakterer. Resultatene indikerer agronomisk og fenotypisk ekvivalens mellom MON89034 og umodifisert kontroll, og at de innsatte genene i MON89034 ikke har medført utilsiktede endringer i egenskaper knyttet til vekst og utvikling hos maisplantene.

## 4 Miljørisikovurdering

Søknad om godkjenning av maishybriden MON89034 under EU forordning 1829/2003/EF og direktiv 2001/18/EF omfatter bruksområdene fôrvarer, næringsmidler, import og prosessering. Søknaden gjelder ikke dyrking. Miljørisikovurderingen av den transgene maislinjen 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 føret med genmodifisert mais representere en mulig kilde til uønsket genspredning.

### 4.1 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 ubeskyttede, 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).

Insektresistens kan bare betraktes å være en selektiv fordel for den transgene planten i områder med målorganismen tilstede og der tiltenkte herbicider benyttes. Overlevelse og spredning av mais til andre habitater i Europa er imidlertid hovedsakelig begrenset av dårlig konkurransevne, manglende frøkvile, mottagelighet for sykdom og liten toleranse for lave temperaturer. Undersøkelsene av fenotypiske karakterer som er foretatt av søker viser ingen forskjeller mellom den insektresistente maislinjen og konvensjonelle sorter med tilsvarende genetisk bakgrunn for disse karakterene. Det er ingen indikasjoner på at de introduserte egenskapene hos MON89034 vil medføre økt fitness, og økt evne til overvintring eller etablering av ugraspopulasjoner utenfor dyrkingsmiljø i forhold til konvensjonelle maissorter.

### 4.2 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 transgene sorter.

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

#### 4.2.1 Horisontal genoverføring (HGT)

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, 2009; VKM 2005).

Ut fra dagens vitenskapelige 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 MON89034 skal kunne overføres til andre enn naturens kryssingspartnere ved detekterbare 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 fôring. 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, Rizzi et al. 2012). 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 laboratorieforsøkene ble det påvist svært små mengder DNA som var overført fra planter til bakterier.

Disse mengdene må imidlertid multipliseres med skalaen for dyrking, som er svært omfattende. I studiene til De Vries & Wackernagel var forutsetningen for overføring sekvenshomologi mellom plantetransgenet og mottagerbakterien. I hvilken grad det forekommer tilfeldig sekvenshomologi mellom plantetransgener og andre naturlig forekommende bakterier er usikkert (Bensasson et al. 2004).

Med bakgrunn i opprinnelse og egenskaper til de innsatte genene og mangel på seleksjonspress i fordøyelseskanal, er sannsynligheten for at horisontal genoverføring vil gi selekterbare fordeler til eksponerte mikroorganismer svært liten (Nielsen 2003). Det er derfor usannsynlig at gener fra MON89034 vil etableres stabilt i genomet til mikroorganismer i miljøet eller i fordøyelseskanalen hos mennesker eller dyr. Det påpekes imidlertid at det er begrensinger i metodikk (Nielsen & Townsend 2004).

#### 4.2.2 Vertikal genoverføring

Tatt i betraktning det tiltenkte bruksområdet for maislinje MON 89034, vil potensialet for vertikal genoverføring være begrenset til utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport, handtering og prosessering av maisen. Eventuell krysspollinering mellom maishybrid MON 89034 og konvensjonelt foredlete maissorter vil videre være betinget av etablering og blomstring av den transgene hybrid. Faggruppen finner det lite sannsynlig at eventuelle sporadiske enkeltplanter av maishybriden vil spre signifikante mengder pollen til konvensjonelle dyrkingsfelt av mais. Risiko for utkryssing med dyrkede sorter vurderes derfor til å være ubetydelig.

Insektresistens kan bare betraktes å være en selektiv fordel for den transgene planten på arealer der målorganismene er til stede under dyrking og der det tiltenkte herbicidet benyttes. Disse egenskapene vil imidlertid ikke representere økt sannsynlighet for spredning av mais. Overlevelse og spredning av mais utenfor dyrking i Europa er hovedsakelig begrenset av dårlig konkurransevne, manglende

frøkvile, mottagelighet for soppsjukdommer og liten toleranse for lave temperaturer. Som for konvensjonelle sorter er det ingenting som tilsier at eventuelle spillplanter av MON 89034 vil overleve til neste vekstsesong eller etablere uønskede populasjoner i Norge.

### 4.3 Potensiale for samspill mellom GMP og målorganismer

Den innsatte genkonstruksjonen i MON 89034 inneholder to bakterielle gener; *cryIA.105* og *cry2Ab2*. *CryIA.105* er et syntetisk gen, som er sammensatt av sekvenser fra genene *cryIAC*, *cryIAb* og *cryIF* fra *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, mens *cry2Ab*-genet stammer fra *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. De innsatte *cry*-genene koder for  $\delta$ -endotoksiner som gir resistens mot enkelte arter i ordenen Lepidoptera, eksempelvis maispyralide (*Ostrinia nubilalis*), "Mediterranean corn borer" (*Sesamia nonagrioides*), "fall armyworm" (*Spodoptera frugiperda*), stort jordfly (*Agrotis ipsilon*), og "corn earworm" (*Helicoverpa zea*). I henhold til søker vil den insektresistente maislinjen MON 89034 være motstandsdyktig mot et videre spekter av skadegjørere i ordenen *Lepidoptera* sammenlignet med MON 810.

I Norge er det rapportert om 10 enkeltfunn av maispyralide (<http://www.nhm.uio.no/fagene/zoologi/insekter/norlep/>). Alle påvisningene er gjort i fylkene Østfold, Vestfold, Telemark, Aust-Agder og Vest-Agder. Det er ikke rapportert om funn av arter av slekten *Sesamia* eller artene *Spodoptera frugiperda* eller *Helicoverpa zea* her i landet.

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.

### 4.4 Potensiale for samspill mellom GMP og ikke-målorganismer

Sporadiske spillplanter av maishybrid MON89034 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 føret 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 gjødsel. 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.

### 4.5 Delkonklusjon

Søknaden gjelder godkjenning av maislinjen MON89034 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 maislinjen 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 foreskrevet bruk av maislinjen MON89034 antas det ikke å være risiko for negative effekter på målorganismer, ikke-målorganismer eller på abiotisk miljø i Norge.

## 5 Overvåking

I følge direktiv 2001/18/EF, annekse 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/NL/2007/37 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 føret 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. Monsanto har derfor ikke utarbeidet spesifikke strategier for risikohåndtering eller en særskilt plan for overvåking av MON89034.

Tatt i betraktning tiltenkt bruksområde for MON89034 anser VKMs faggruppe for genmodifiserte organismer at det ikke er behov for å iverksette særskilt program for overvåking av maislinjen.

## Konklusjon

### Molekylær karakterisering

Faggruppen vurderer karakteriseringen av det rekombinante DNA-innskuddet i maislinje MON89034, og de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av proteinene til å være tilfredsstillende. Faggruppen har ikke identifisert noen risiko knyttet til det som framkommer av den molekylærbiologiske karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i MON89034. Faggruppen har tidligere vurdert de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av proteinene og funnet at informasjonen er tilstrekkelig (VKM 2008a, 2012).

### Komparative analyser

Feltforsøk i USA og Europa viser små eller ingen signifikante forskjeller mellom den transgene maishybriden MON89034 og korresponderende, nær-isogene kontrollhybrider med hensyn på morfologiske og agronomiske karakterer. Resultatene indikerer agronomisk og fenotypisk ekvivalens mellom MON89034 og umodifisert kontroll, og at de innsatte genene i MON89034 ikke har medført utilsiktede endringer i egenskaper knyttet til vekst og utvikling hos maisplantene.

### Miljørisiko

Søknaden gjelder godkjenning av maislinjen MON89034 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 maislinjen 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 foreskrevet bruk av maislinjen MON89034 antas det ikke å være risiko for negative effekter på målorganismer, ikke-målorganismer eller på abiotisk miljø i Norge.

### Samlet vurdering

VKMs faggruppe for genmodifiserte organismer finner det lite trolig at den omsøkte bruken av maislinje MON89034 vil medføre endret risiko for miljø sammenlignet med annen mais.



## Referanser

- Bensasson D, Boore JL, Nielsen KM (2004) Genes without frontiers. *Heredity* 92: 483-489.
- CERA (2013) Center for Environmental Risk Assessment. GM Database for safety information. [http://cera-gmc.org/index.php?action=gm\\_crop\\_database](http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database)
- Crop Protection Compendium (2007) <http://www.cabicompendium.org/cpc/home.asp>
- 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.
- 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](http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_opinions/384.html)
- EFSA (2005) Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on an application (EFSA/GMO/UK/2004/06) for the placing on the market of insect protected glyphosate tolerant genetically modified maize MON863 x NK603 for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 by Monsanto. *The EFSA Journal* 255: 1-21.
- EFSA (2006) Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. ISBN: 92-9199-019-1. European Food Safety Authority, Parma, Italy. 100 p. [http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo\\_guidance/660.html](http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_guidance/660.html)
- EFSA (2008) Scientific Opinion: Application (Reference EFSA-GMO-NL-2007-37) for the placing on the market of the insect-resistant genetically modified maize MON89034, for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from Monsanto. *The EFSA Journal* 909: 1-30.
- EFSA (2009) Use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. Scientific Opinion of the Panel on Genetically Modified Organisms (GMO) and the Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *The EFSA Journal* 1034: 1-82. [http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Statement/gmo\\_biohaz\\_st\\_ej1108\\_ConsolidatedARG\\_en.pdf?ssbinary=true](http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Statement/gmo_biohaz_st_ej1108_ConsolidatedARG_en.pdf?ssbinary=true)
- EFSA (2010) Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. Scientific opinion from the EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). *EFSA Journal* 8 (11):1-111. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1879.pdf>
- EFSA (2011) Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. Scientific opinion from the EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). *The EFSA Journal* 9(5): 2150. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2150.pdf>
- Hallauer AR (2000) Potential for outcrossing and weediness of genetically modified insect protected corn. APHIS-USDA.

- Heinemann JA, Traavik T (2004) Problems in monitoring horizontal gene transfer in field trials of transgenic plants. *Nat Biotechnol* 22: 1105–1109 doi: 10.1038/nbt1009
- Lid J, Lid DT (2005) Norsk flora. Det Norske Samlaget, Oslo. 7. utgave. ISBN: 82-521-6029-8. 1230s.
- Netherwood T, Martín-Orúe SM, O'Donnell AG, Gockling S, Graham J, Mathers JC, Gilbert HJ. (2004) Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nature Biotechnology* 22: 204-209.
- Nielsen KM, van Elsas JD, Smalla K (2000) Transformation of *Acinetobacter* sp. BD413 (pFG4deltanptII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Applied Environmental Microbiology* 66: 1237-1242.
- Nielsen K (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 (Italy)* 1: 96-149.
- Nielsen KM, Townsend JP. (2004) Monitoring and modeling horizontal gene transfer. *Nature Biotechnology* 22(9): 1110-1114.
- 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.
- Rizzi A, Raddadi N, Sorlini C, Nordgård L, Nielsen KM, Daffonchio D (2012) The stability and degradation of dietary DNA in the gastrointestinal tract of mammals - implications for horizontal gene transfer and the biosafety of GMOs. *Crit Rev Food Science Nutr* 52: 142-161.
- Schubbert GW, 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.
- Townsend J P, Bøhn T, Nielsen K M (2012) Probability of detecting horizontal gene transfer in bacterial populations. *Front Microbiol* 3, art. 27
- VKM (2005) 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 (2008a) Helse- og miljørisikovurdering av genmodifisert maislinje MON 89034 (EFSA/GMO/NL/2007/37). Uttalelse fra Faggruppen for genmodifisert organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet 9.5.2008.
- VKM (2008b) Helse- og miljørisikovurdering av genmodifisert mais MON 89034 x MON 88017 (EFSA/GMO/NL/2007/39). Uttalelse fra Faggruppen for genmodifisert organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet 9.5.2008.

VKM (2009a) Helse- og miljørisikovurdering av genmodifisert mais MON 89034 x 1507 x MON 88017 x 59122 (EFSA/GMO/CZ/2008/62). Uttalelse fra Faggruppen for genmodifisert organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet 25.9.2009.

VKM (2009b) Helse- og miljørisikovurdering av genmodifisert mais MON 89034 x 1507 x NK603 (EFSA/GMO/NL/2009/65). Uttalelse fra Faggruppen for genmodifisert organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet 22.10.2009.

VKM (2010a) Miljørisikovurdering av genmodifisert mais MON 89034 x MON 88017 (EFSA/GMO/BE/2009/71). Uttalelse fra Faggruppen for genmodifisert organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet 1.4.2010.

VKM (2010b) Miljørisikovurdering av genmodifisert mais MON 89034 x NK603 (EFSA/GMO/NL/2009/72). ). Uttalelse fra Faggruppen for genmodifisert organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet 7.4.2010.

VKM (2012) Foreløpig miljørisikovurdering av genmodifisert mais MON 89034 (EFSA/GMO/BE/2011/90). Uttalelse fra Faggruppen for genmodifisert organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet 7.11.2012.

# Vedlegg 1

## 7.9 Allergenicity

### 7.9.2 Assessment of allergenicity of the whole GM plant or crop

#### Innspill fra VKMs GMO-panel

Scientific studies, also very recent ones, have shown that the Cry1Ac protein is a potent systemic and mucosal adjuvant, which is an enhancer of immune responses. The GMO Panel of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety find it difficult, based on the available data, to assess whether kernels from maize MON89034 may cause more allergenic reactions than food and feed from unmodified kernels. As the different Cry proteins are closely related, and in view of the experimental studies in mice, the GMO Panel finds that the likelihood of an increase in allergenic activity due to mCry3A protein in food and feed from maize MON89034 cannot be excluded. Thus, the Panel's view is that as the adjuvant effect of mCry3A with reasonable certainty cannot be excluded, the applicant in relation to a possible adjuvant effect of mCry3A must comment upon the mouse studies showing humoral antibody response of Cry1A proteins. Further, although the mCry3A protein is rapidly degraded in gastric fluid after oral uptake, there is also the possibility that the protein can enter the respiratory tract after exposure to e.g. mill dust. Finally, rapid degradation is no absolute guarantee against allergenicity or adjuvanticity.

#### References

- Moreno-Fierros L, Ruiz-Medina EJ, 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.
- Prasad S.S.S.V, Shethna YI (1975) Enhancement of immune response by the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 62: 517-521.
- Rojas-Hernández S, Rodríguez-Monroy MA, López-Revilla R, Reséndiz-Albor AA, Moreno-Fierros L. (2004) Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infect Immun.*, 72:4368-4375
- Vazquez-Padron RI, Martinez-Gil AF, Ayra-Pardo C, Gonzalez-Cabrera J, Prieto-Samsonov DL, de la Riva GA. (1998) Biochemical characterization of the third domain from *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. *Biochem Mol Biol Int.*, 45(5):1011-20.