



Vitenskapskomiteen for mattrygghet
Norwegian Scientific Committee for Food Safety

Miljørisikovurdering av genmodifisert maishybrid MON863 x NK603 til mat, fôr, import og prosessering under EU-forordning 1829/2003/EF (EFSA/GMO/UK/2004/06)

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

Dato: 19.3.2013

Dok. nr.: 12/318-endelig

ISBN: 978-82-8259-080-8

VKM Report 2013: 17



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 maishybriden MON 863 x NK603 fra Monsanto Company ble godkjent til import, videreføring og bruk som mat og fôr under EU-forordning 1829/2003 i 2010 (søknad EFSA/GMO/UK/2004/06). MON863 x NK603 er ikke tidligere vurdert av VKMs faggruppe for genmodifiserte organismer med hensyn på miljørisiko. I forbindelse med EFSA's offentlige høring av søknad EFSA/GMO/UK/2004/06 i 2005, vurderte VKM maishybriden med hensyn på mulig helserisiko (VKM 2005a).

Risikovurderingen er basert på uavhengige vitenskapelige publikasjoner og dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSA's 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 EFSA's 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.

Maishybriden MON863 x NK603 er resultat av konvensjonelle kryssinger mellom foreldrelinjene MON863 og NK603.

Foreldrelinje MON863 er produsert ved biolistisk transformasjon av den innavlete maislinjen A634, og inneholder et modifisert *cry3Bb1*-gen fra jordbakterien *Bacillus thuringiensis* subsp. *kumamotoensis*. Cry3Bb1-proteinet som uttrykkes gir plantene toleranse mot angrep fra arter i billeslekten *Diabrotica*. Maislinjen inneholder også antibiotikaresistensmarkørgenet *nptII*, som uttrykker resistens mot aminoglykosider som kanamycin og neomycin.

Foreldrelinje NK603 uttrykker CP4-EPSPS-proteiner, som et resultat av introduksjon av *cp4-epsps*-genet fra jordbakterien *Agrobacterium tumefaciens*. Genet koder for enzymet 5-enolpyruvylsukinat-3-fosfat syntetase, som omdanner fosfoenolpyruvat og sukinat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsukinat-3-fosfat, en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. I motsetning til plantens enzym er det bakterielle enzymet også aktivt ved nærvær av N-fosfonometyl glycin (glyfosat). De transgene plantene vil derfor tolerere høyere doser av herbicider med virkestoff glyfosat sammenlignet med konkurrerende ugras.

Molekylær karakterisering

F₁-hybriden MON863 x NK603 er dannet ved konvensjonelle kryssinger mellom de transgene maislinjene MON 863 og NK603. 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 Cry3Bb1- og CP4 EPSPS-proteiner i frø og vegetativt vev er sammenlignbare med uttrykket av tilsvarende proteinprodukter i foreldrelinjene.

Komparative analyser

Feltforsøk over en vekstsesong i Argentina viser små eller ingen signifikante forskjeller mellom den transgene maishybriden MON863 x NK603 og umodifisert, nær-isogen kontroll med hensyn på morfologiske og agronomiske karakterer.

Antibiotikaresistens

Maishybriden MON863 x NK603 inneholder antibiotikaresistensmarkørgenet *nptII*. Faggruppen konkluderer med at risikoen for nedsatt terapieffekt ved enkelte infeksjoner i husdyrproduksjon forårsaket av spredning av *nptII*-genet fra maishybriden antas å være lav grunnet begrenset mulighet for positiv seleksjon av sjeldne HGT-begivenheter, samt at andre aminoglykosid-resistens determinanter finnes ved variabel prevalens i relevante bakteriepopulasjoner.

Det påpekes videre store forskjeller i geografisk utbredelse av antibiotikaresistens i Europa, og at det mangler publisert dokumentasjon på forekomsten av *nptII*-genet i Norge. Det foreligger ikke vitenskapelig litteratur som indikerer at forekomsten av *nptII*-genet i Norge er utbredt. Det påpekes også at neomycin benyttes i norsk landbruk, og at et seleksjonstrykk på eventuelle sjeldne transformanter derfor ikke kan utelukkes.

Øvrig miljørisiko

Søknad EFSA/GMO/UK/2004/06 gjelder godkjenning av maishybrid MON863 x NK603 til import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av maisen.

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 MON 863 x NK603 antas det ikke å være risiko for negative effekter på målorganismer, ikke-målorganismer (med mulig unntak av mikrober) eller på abiotisk miljø i Norge.

Samlet vurdering

Risikoen for nedsatt terapieffekt ved enkelte infeksjoner i husdyrproduksjon forårsaket av spredning av *nptII*-genet fra MON863 x NK603 antas å være lav grunnet begrenset mulighet for positiv seleksjon av sjeldne HGT begivenheter, samt at andre aminoglykosidresistens determinanter finnes ved variabel prevalens i relevante bakteriepopulasjoner.

Det påpekes store forskjeller i geografisk utbredelse av antibiotikaresistens i Europa, og at det mangler publisert dokumentasjon på forekomsten av *nptII*-genet i Norge. Det foreligger ikke vitenskapelig litteratur som indikerer at forekomsten av *nptII*-genet i Norge er utbredt. Det påpekes også at neomycin benyttes i norsk landbruk, og at et seleksjonstrykk på eventuelle sjeldne transformanter derfor ikke kan utelukkes.

VKMs faggruppe for genmodifiserte organismer finner det lite trolig at den omsøkte bruken av maislinje MON 863 x NK603 vil medføre endret risiko når det gjelder miljø sammenlignet med annen mais.

Nøkkelord

Mais, *Zea mays* L., genmodifiserte maishybrid MON 863 x NK603, EFSA/GMO/UK /2004/06, insektresistens, herbicidtoleranse, glyfosat, Cry3Bb1, NPTII, CP4-EPSPS, 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).
ARMG	Antibiotikaresistensmarkør-gen
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 ₁ , BC ₂ 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.
CP4	<i>Agrobacterium</i> sp. stamme CP4
CP4 EPSP	Glyfosattolerant EPSPS
<i>cp4 epsps</i>	DNA-sekvens fra <i>Agrobacterium</i> sp. stamme CP4, koder for CP4 EPSPS-protein, som inaktiverer glyfosat.
Cry	Krystallprotein fra <i>Bacillus thuringiensis</i>
Cry3Bb1	δ-endotoksin, som gir plantene resistens mot angrep fra bladbiller i slekten <i>Diabrotica</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.

NPTII	Neomycin phosphotransferase II
<i>nptII</i>	DNA- sekvens som koder for enzymet neomycin phosphotransferase II
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
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: melkematning
	R4: deigmatning
	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

Bidragstere	1
Sammendrag	3
Nøkkelord	5
Forkortelser og ordforklaringer	6
Innholdsfortegnelse	8
Bakgrunn	9
Oppdrag fra Direktoratet for naturforvaltning	10
Risikovurdering	11
1 Innledning	11
1.1 Beskrivelse av egenskaper og virkningsmekanismer	11
2 Molekylær karakterisering	11
2.1 Hybridproduksjon	11
2.2 Evaluering av foreldrelinjer	12
2.2.1 Foreldrelinje MON863.....	12
2.2.2 Foreldrelinje NK603	16
2.3 Hybriden MON863 x NK603	19
2.4 Delkonklusjon	20
3 Komparative analyser	21
3.1. Agronomiske karakterer	21
3.2. Delkonklusjon	21
4 Miljøriskovurdering	22
4.1 Potensiale for utilsiktede effekter på fitness relatert til genmodifiseringen	22
4.2 Potensiale for genoverføring	22
4.2.1 Horisontal genoverføring (HGT)	23
4.2.2 Vertikal genoverføring	25
4.3 Potensiale for samspill mellom GMP og målorganismer	25
4.4 Potensiale for samspill mellom GMP og ikke-målorganismer	25
4.5 Delkonklusjon	26
5 Overvåking	26
6 Kunnskapshull	27
Konklusjon	28
Referanser	30

Bakgrunn

Den genmodifiserte maishybriden MON863 x NK603 (Unik kode MON-ØØ863-5 x MON-ØØ6Ø3-6) fra Monsanto Company ble søkt godkjent til import, prosessering, og som mat og fôr under EU-forordning 1829/2003/EF i 2004 (EFSA/GMO/UK/2004/06). Søknaden ble fremmet og anbefalt av belgiske myndigheter i november 2004, og funnet komplett og lagt ut på offentlig høring på EFSA's GMO Extranet 4.1. 2005. EFSA's helse- og miljørisikovurdering av maishybriden ble publisert 6. juli 2005 (EFSA 2005), og søknaden godkjent 2. mars 2010 (Kommissjonsbeslutning 2010/141/EU).

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.

MON863 x NK603 er ikke tidligere vurdert av VKMs faggruppe for genmodifiserte organismer med hensyn på miljørisiko. I forbindelse med EFSA's offentlige høring av søknad EFSA/GMO/UK/2004/06 i 2005, vurderte VKM maishybriden med hensyn på mulig helserisiko (VKM 2005a).

Utenfor EU/EØS-området er MON863 x NK603 godkjent for alle bruksområder (inkludert dyrking) i Japan (CERA 2013). I tillegg er maislinjen godkjent for omsetning som mat og/eller fôr i Sør-Korea, Taiwan 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 plantevernmidler 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

Miljørisikovurderingen av den genmodifiserte maishybriden MON863 x NK603 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. MON863 x NK603 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

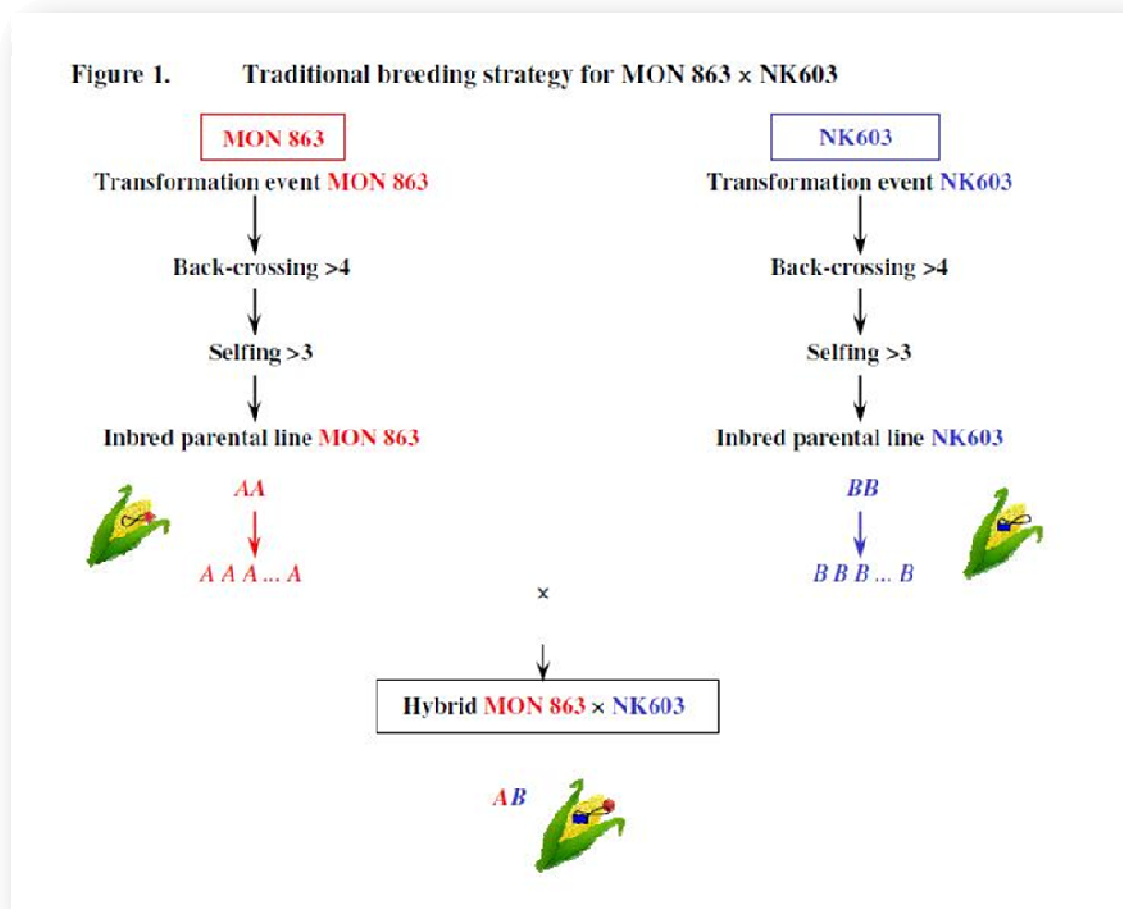
Foreldrelinjen MON863 er produsert ved biolistisk transformasjon (partikkelakselerasjon) av kallusvev fra den innavlede maislinjen A634. Linjen har vært mye benyttet i produksjon av konvensjonelle hybridsorter i USA. Den innsatte genkonstruksjonen inneholder *cry3Bb1*-genet fra jordbakterien *B. thuringiensis* subsp. *kumamotoensis*. Uttrykket av *cry*-genet kontrolleres av en modifisert utgave av *CaMV 35 S* promotoren (4-AS1) fra blomkålmosaikkvirus. *Cry3Bb1*-genet koder for et δ -endotoksin, som gir plantene toleranse mot angrep fra arter i billeslekten *Diabrotica*. Maislinjen inneholder også antibiotikaresistensmarkørgenet *nptII* fra *E. coli*, under kontroll av promotoren *CaMV 35 S*. *NptII* koder for enzymet neomycin fosfotransferase II, og gir resistens mot aminoglykosidantibiotika som kanamycin og neomycin. Genet er introdusert som seleksjonsmarkør for identifikasjon av transformanter under regenerasjonen.

Foreldrelinje NK603 uttrykker CP4-EPSPS-proteiner, som er resultat av introduksjon av *cp4-epsps*-genet fra jordbakterien *Agrobacterium tumefaciens*. Genet koder for enzymet 5-enolpyruvylsukinat-3-fosfatsyntetase, som omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsukinat-3-fosfat, en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. I motsetning til plantens enzym er det bakterielle enzymet også aktivt ved nærvær av N-fosfonometylglycin (glyfosat). De transgene plantene vil derfor tolerere høyere doser av herbicider med virkestoff glyfosat sammenlignet med konkurrerende ugras.

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 hybrid MON863 x NK603 er dannet ved konvensjonelle kryssinger mellom maislinjene MON863 og NK603 (figur 1).



Figur 1. Kryssingsskjema for maishybriden MON863 x NK603.

2.2 Evaluering av foreldrelinjer

2.2.1 Foreldrelinje MON863

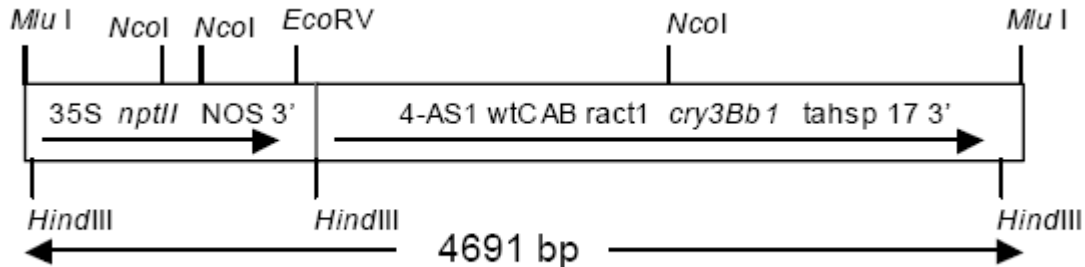
Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

MON863 inneholder et rekombinant DNA-fragment på 4691 basepar fra PV-ZMIR13-plasmidet. DNA-fragmentet inkluderer to ekspresjonskassetter. Ekspresjonskassetene inneholder henholdsvis ett *cry3Bb1*-gen med regulatoriske områder og ett *nptII*-gen med regulatoriske områder (tabell 1, figur 2).

Cry3Bb1- og *nptII*-ekspresjonskassetene inneholder følgende DNA-elementer:

- CaMV *e35s* promotor,
- *nptII* åpen leseramme som koder for proteinet NPTII,
- trunkert *ble* (150 basepar) og *NOS* 3'-termineringsekvens for transkripsjon,
- *4ASI* 4 tandemkopier av ASI (modifisert *35s* promotor),
- *wtCAB* 5'-mRNA-ledersekvens fra hvete, klorofyll *a/b* protein,

- *rac1* intron fra ris, aktin 1 gen,
- *cry3Bb1 ORF*, som koder for Cry3Bb1-proteinet,
- *tahsp17* 3'-polyadeninsekvens fra hvete *hsp17.3* gen som avslutter ekspresjonen.



Figur 2. Illustrasjon av det rekombinante DNA-fragment i genomet til maislinjen MON863.

Karakterisering av geninnsettingen og det rekombinante DNA-fragmentet

Det er foretatt en rekke undersøkelser av antall kopier av ekspresjonskassetene og antall insersjonssteder i genomet. Videre er det foretatt sekvensering av DNA oppstrøms og nedstrøms for innsettsstedet (5'- og 3'-flankesekvenser). I tillegg er integriteten til ekspresjonskassetene i genomet, fravær av andre åpne leserammer enn de som er satt inn, og fravær av annet transformasjonsplasmid DNA i MON863 vurdert.

Det konkluderes med at det er kun én kopi av ekspresjonskassetten i MON863. Sammenlignende DNA-analyser mellom MON 863 og ikke-transgen hybridlinje MON864 (A1xA634) viser at bruttostørrelsen på det innsatte DNA-fragmentet er intakt.

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

I henhold til dokumentasjon fra søker er nivået av uttrykk av Cry3Bb1-protein målt i prøver av hel plante, blad, røtter, og frø fra fire feltforsøk i USA vekstsesongen 1999. I tillegg ble konsentrasjon av Cry3Bb1 målt i hunnblomster (arrene) fra forsøk i USA og Argentina, mens toksinnivået i pollen ble målt i plantemateriale fra tre lokaliteter i Argentina. Nivået av Cry3Bb1-protein varierte mellom 10 og 81 µg/g råvekt, avhengig av utviklingsstadium og vevstype. Konsentrasjonen av proteinet i blad, hel plante og rotvev ble redusert utover i vekstsesongen, og var i gjennomsnitt 81 µg/g i unge blad, 70 µg/g i frø, 41 µg/g i røtter, 39 µg/g i hel plante og 62 µg/g i pollen.

Uttrykk av NPTII ble målt i unge blad, hel plante og frø av MON 863, og varierte fra ikke detekterbar (< 0,076 µg/g) til 1,4 µg/g råvekt.

Tabell 1. Genelementer fra plasmid PV-ZMIR13, som er satt inn i genomet til MON863.

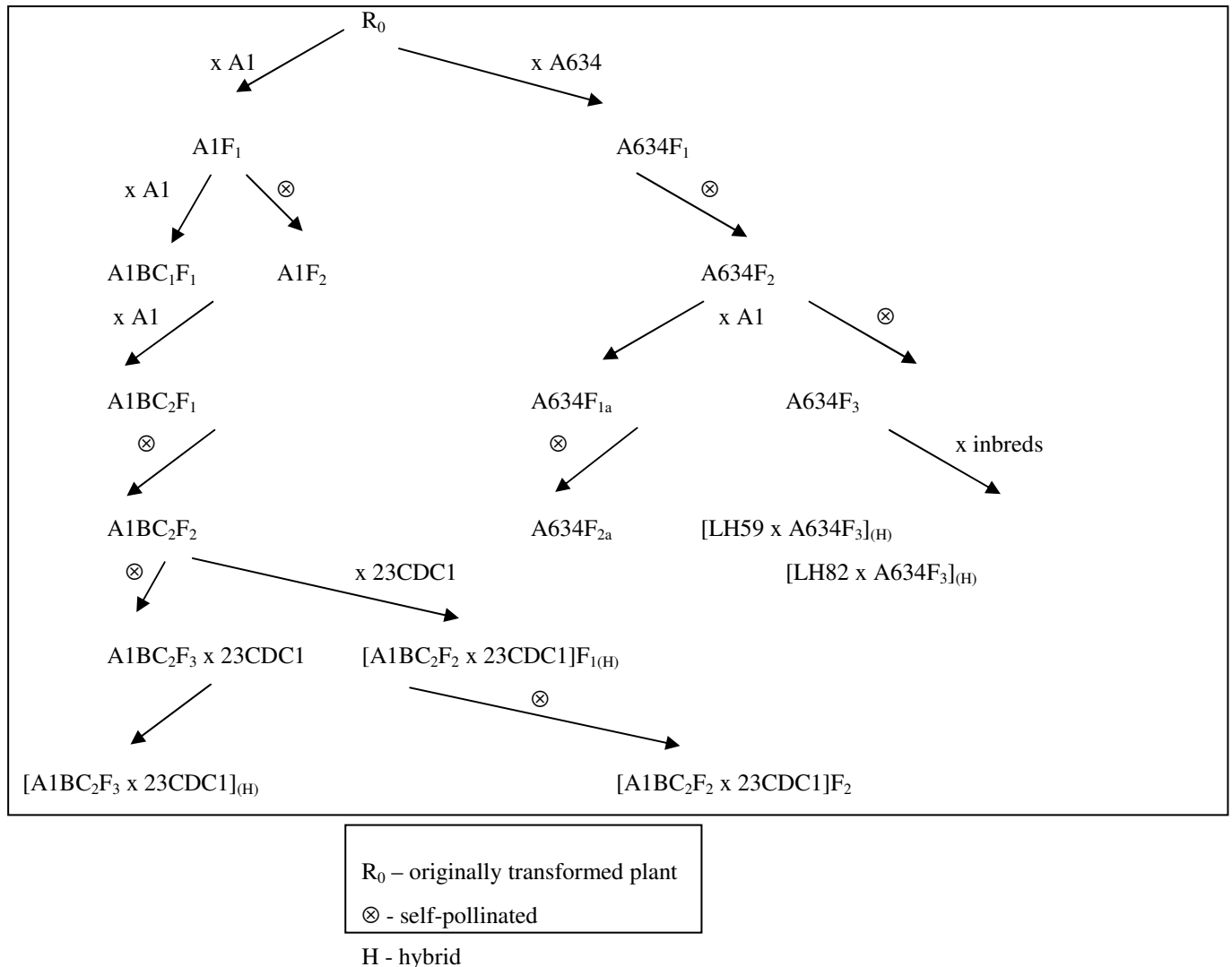
Genetic Element	Size (kb)	Function
<i>cry3Bb1</i> gene cassette:		
4-AS1	0.22	Promoter for the <i>cry3Bb1</i> gene in MON863 corn. The promoter consists of four tandem repeats of activating sequence-1 (AS1)(Lam and Chua 1990) and a single portion of the 35S promoter (Odell et al 1985) both derived from cauliflower mosaic virus (CaMV). AS1 is a 21 base pair element associated with the 35S promoter, which has been linked with high levels of protein expression in roots (Lam et al 1989).
wt CAB	0.06	The 5' non-translated leader sequence of the wheat chlorophyll a/b binding protein. This leader sequence facilitates mRNA translation (Lamppa et al 1985).
ract 1 intron	0.49	The first intron from the rice actin 1 gene, which enhances DNA transcription (McElroy et al 1990).
<i>cry3Bb1</i>	1.96	The coding sequence for the Cry3Bb1 variant protein produced in <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kumamotoensis</i> .
tahsp 17 3'	0.23	The 3' nontranslated region of the coding sequence for wheat heat shock protein 17.3, which ends transcription and directs polyadenylation (McElwain and Spiker 1989).
Selectable marker:		
35S	0.35	The 35S promoter from CaMV (Odell et al 1985).
<i>nptII</i>	0.97	Coding sequence for gene encoding the enzyme neomycin phosphotransferase II from <i>Escherichia coli</i> transposon Tn5 (Beck et al 1982). The DNA derived from <i>E. coli</i> also includes a 153 base pair segment of the bleomycin binding protein gene (<i>ble</i>). The fragment of <i>ble</i> is located 20 base pairs downstream of the <i>nptII</i> stop codon.
NOS 3'	0.26	The 3' nontranslated region of the nopaline synthase gene of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA, which ends transcription and directs mRNA polyadenylation (Bevan et al 1983).

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

Monsanto viser til en rekke undersøkelser som dokumenterer at det rekombinante DNA-innskuddet er stabilt integrert i genomet, og stabilt nedarvet over generasjoner. Analyser av Southern blot viser stabilitet av det rekombinante innskuddet over 3 selvpollineringsgenerasjoner og 9 generasjoner fra kryssinger av R₀ x A1 and R₀ x A634 (figur 3). Videre er fenotypisk stabilitet demonstrert ved spaltingsdata fra tre kryssingsgenerasjoner og to generasjoner med selvbestøvning etter R₀ x A1. Segregeringsanalysene (Chi-kvadrat-analyser) viser forventet mendelsk nedarving av *cry3Bb1*-genet.

Delkonklusjon

Faggruppen har tidligere vurdert karakteriseringen av det rekombinante innskuddet, de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av MON863 til å være tilfredsstillende (VKM 2006, 2008).



Figur 3. Kryssingsskjema for genmodifisert maislinje MON863.

2.2.2 Foreldrelinje NK603

Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

Cp4-epsps-genet fra *Agrobacterium*-stamme CP4 ble klonet inn i plasmidet PV-ZMGT32. Det rekombinante DNA-fragmentet på 6706 basepar fra PV-ZMGT32-plasmidet inneholder to ekspressjonskassetter med et enkelt *cp4-epsps*-gen i hver kassett. Den første kassetten inneholder en aktinpromotor og et intron (r-act P+I) fra ris, et optimalisert kloroplastoverføringspeptid (CTP2), og en nopalinsyntase 3'-ende terminatorsekvens (NOS3'). Den andre ekspressjonskassetten inneholder en *e35S*-promotor, et ZmHSP70 intron *cp4-epsps* gen og en nopalinsyntase 3'-ende terminatorsekvens (NOS3'). DNA-fragmentet ble overført til embryogene maisceller ved hjelp av partikkelaksellerasjonsmetoden. DNA-fragmentet inneholder ikke antibiotikaresistensgen. Transformanter ble selektert ved at de overlevde og vokste i nærvær av glyfosat.

Beskrivelse av de innsatte genene

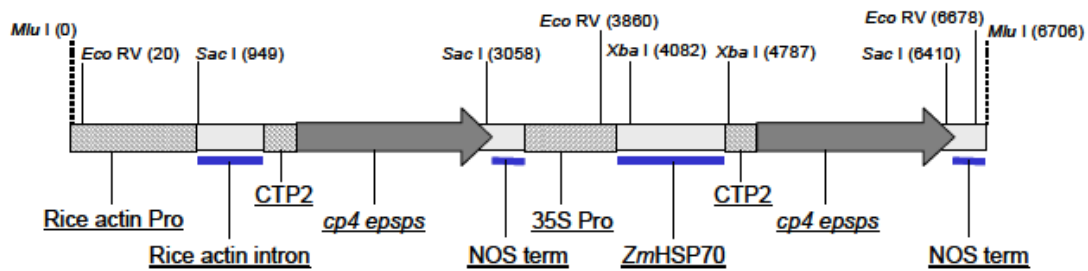
Det er benyttet Southern blot og sekvensering for å karakterisere det rekombinante DNA-fragmentet i planten. Den molekylærbiologiske karakteriseringen viser at det er satt inn et rekombinant DNA-fragment i NK603 førmais. Innsatte gener og regulatoriske elementer i fragmenter er vist i tabell 2, og figur 4.

Tabell 2. Beskrivelse av innsatte gener og regulatoriske elementer i NK603.

CP4-epsps ekspresjonskasset 1	
<i>P-RactI/I-RactI</i>	Promoter og intron fra ris (<i>Oryza sativa</i>) aktin 1 gen (1,4 kb). Uttrykkes ikke i planten.
<i>TS-CTP2</i>	N-terminal kloroplasttransittpeptid (TS-CTP) fra EPSPS-genet fra vårskrinneblom (<i>Arabidopsis thaliana</i>)-genet. Overfører CP4-EPSPS protein til kloroplast.
<i>CS-Cp4-epsps</i>	Gen som koder for et syntetisk CP4-EPSPS protein. Genet <i>5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase</i> stammer fra jordbakterien <i>Agrobacterium tumefaciens</i> stamme CP4 (1,4 kb).
<i>T-nos 3'</i>	DNA- sekvens fra <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Avslutter transkripsjonen. Uttrykkes ikke i planten.
CP4-epsps ekspresjonskasset 2	
<i>P-e35S</i>	Promoter fra blomkålmosaikkvirus (<i>Cauliflower mosaic virus</i>) (0,6 kb). Uttrykkes ikke i planten.
<i>I-Hsp70</i>	Promoter fra heatshockprotein 70 (0,8 kb). Stammer fra mais.
<i>TS-CTP2</i>	N-terminal kloroplasttransittpeptid (TS-CTP) fra EPSPS-genet fra vårskrinneblom (<i>Arabidopsis thaliana</i>)-genet. Overfører CP4-EPSPS protein til kloroplast.
<i>CS-Cp4-epsps l214p</i>	Gen som koder for et syntetisk CP4-EPSPS protein. Genet <i>5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase</i> stammer fra jordbakterien <i>Agrobacterium tumefaciens</i> stamme CP4 (1,4 kb).
<i>T-nos 3'</i>	DNA-sekvens fra <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Avslutter transkripsjonen. Uttrykkes ikke i planten.

Karakterisering av geninnsettingen

Molekylærbiologisk analyser av NK603 viser at det rekombinante fragmentet i planten inneholder de samme gener og genelementer som er på det tilsvarende fragmentet i bakterien. EPSPS-proteinet som uttrykkes i NK603 er, med unntak av en aminosyre, identisk med proteinet som uttrykkes i bakterien.



Figur 4. Rekombinant lineært DNA-fragment i genomet til maislinjen NK603. Det rekombinante DNA-fragmentet er på 6706 basepar og stammer fra plasmidet PV-ZMGT32.

Ved revers transkriptase PCR (RT PCR) ble det påvist et transkripsjonsprodukt som startet inne i det rekombinante fragmentet. Transkripsjonen gikk gjennom NOS-terminatoren og inn i maisgenomets flankerende 3' område. To eller flere mRNA-molekyler ble dannet, ett på 1,4 kb (antatt å være *cp4-epsps L214P* transkriptet) og ett større enn 1,4 kb (antatt gjennomlesning av NOS). RT PCR viste at kun en svært liten del av det store fragmentet inneholdt *cp4-epsps* sekvens. I motsetning til transkriptet på 1,4 kb, kunne ikke dette transkriptet påvises med Northern blot.

Flankerende sekvenser til det rekombinante DNA-fragmentet i planten er analysert, 300 bp oppstrøms og 500 bp nedstrøms. Sammenlignende analyse med foreldrelinjen LH82xB73 viste at de flankerende sekvensene til NK603s DNA-fragment stammer fra foreldrelinjen.

Strukturell og funksjonell likhet mellom CP4 EPSPS og CP4 EPSPS1214p er undersøkt med røntgenkristallanalyse, variabel løkkestruktur i proteinet som inneholder det nye prolinet, og domenet som inneholder det nye prolinet. Disse analysene viser at CP4 EPSPS 1214p-proteinene er strukturelt lik CP4 EPSPS-proteinene. Analyse av enzymatisk aktivitet viser ingen forskjell mellom de to proteinene. Fordøyelighetstest viste også at begge proteinene fordøyes like raskt i simulert mage- og tarmsaft. Mengde CP4-EPSPS i korn er anslått til 0,01 % av den totale proteinmengden.

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

Krysning over seks generasjoner og tre selvpollineringsgenerasjoner viser at det rekombinante EPSPS-fragmentet er stabilt inkorporert i maisgenomet.

Delkonklusjon

Faggruppen har tidligere vurdert de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av CP4 EPSPS-proteinene og funnet at informasjonen er tilstrekkelig (VKM 2005b). Faggruppen konkluderer med at karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i NK603 er tilfredsstillende.

2.3 Hybriden MON863 x NK603

Molekylær karakterisering

MON863 x NK603 er dannet ved konvensjonelle kryssinger mellom foreldrelinjene MON863 og NK603. Det er foretatt Southern blot-analyse for å undersøke tilstedeværelse og antall kopier av MON863- og NK603-ekspresjonskassetene i maishybriden MON863 x NK603. Det er påvist én enkel kopi av henholdsvis MON863- og NK603-ekspresjonskassetene. Monsanto hevder at analyser av insersjonssteder i genomet, sekvensering av DNA oppstrøms og nedstrøms for innsettingsstedet, integriteten til ekspresjonskassetene i genomet, fravær av andre åpne leserammer enn de som er satt inn fra de to hybridene, og fravær av annet transformasjonsplasmid-DNA i NK603 og MON863 ikke er nødvendig fordi det er liten sannsynlighet for molekylær gjensidig påvirkning mellom innskuddene fra MON863 og NK603 i MON863 x NK603 fordi de to ekspresjonskassetene ligger på hvert sitt kromosom.

Sammenlignende Southern blot-analyser mellom hybridene MON863 x NK603 og de to foreldrelinjene viser at bruttostørrelsen på de innsatte DNA-fragmentene er intakte. Det kan derfor ikke forventes endringer i ekspresjonen fra disse elementene.

Informasjon vedr. uttrykk av introduserte gener og åpne leserammer

Det har blitt utført feltstudier i Argentina på fire ulike lokaliteter (to i Buenos Aires, og to i Córdoba), vekstsesongen 2002–2003. Mais-hybrider, foreldrelinjene MON863 og NK603, samt en umodifisert kontroll-mais ble sådd etter en randomisert blokk-design i tre gjentak for hver av sortene. Maisen ble analysert ved bruk av ELISA for nivåer av uttrykte proteiner for hver av de innsatte genene: *cry3Bb1*, *cp4-epsps* og *nptII*. Verdiene som er oppgitt i søknaden for hybridmais (Technical dossier, 22. October 2004) er kun vist for fôr og korn. Verdiene er oppgitt for både tørrvekt (tabell 3) og råvekt (tabell 4), og viser at uttrykket av de innsatte genene i hybridmais er i tråd med nivåene av proteinene i de respektive foreldrelinjene.

Tabell 3. Proteininnhold (µg/g tørrvekt) i korn og fôr for de innsatte genene i hybridmais MON863 x NK603, og de tilsvarende foreldrelinjene. Verdiene oppgitt for CP4 EPSPS representerer summen av CP4 EPSPS og CP4 EPSPS L214P, ettersom ELISA ikke skiller mellom disse.

Maislinje		Cry3Bb1 µg/g t.v. ± S.D.	CP4 EPSPS µg/g t.v. ± S.D.	NPTII µg/g t.v. ± S.D.
MON863 x NK603	Maiskorn	34 (5,4)	11 (1,5)	Under deteksjonsgrensen (0,21 µg/g ferskvekt)
	Fôr	40 (7,9)	110 (26)	
MON863	Maiskorn	29 (3,9)		Under deteksjonsgrensen (0,21 µg/g ferskvekt)
	Fôr	39 (15)		
NK603	Maiskorn		12 (1,8)	

Tabell 4. Proteininnhold ($\mu\text{g/g}$ råvekt) i korn og fôr for de innsatte genene hybridmais MON863 x NK603, og de tilsvarende foreldrelinjene.

Maislinje		Cry3Bb1 $\mu\text{g/g}$ f.v. \pm S.D. variasjonsområde	CP4 EPSPS $\mu\text{g/g}$ f.v. \pm S.D. variasjonsområde	NPTII $\mu\text{g/g}$ f.v. \pm S.D. variasjonsområde
MON863 x NK603 (n = 12)	Maiskorn	29 (SD 4,9) 23 - 42	9,7 (SD 1,2) 7,5 - 12	Under deteksjonsgrensen (0,21 $\mu\text{g/g}$ ferskvekt)
	Fôr	11 (SD 2,4) 8,4 - 17	30 (SD 7,3) 12 - 39	
MON863 (n = 12)	Maiskorn	25 (SD 3,5) 21 - 32		Under deteksjonsgrensen (0,21 $\mu\text{g/g}$ ferskvekt)
	Fôr	11 (SD 4,8) 5,4 - 19		
NK603 (n = 12)	Maiskorn		10 (SD 1,5) 7,7 - 13	
	Fôr		28 (SD 5,5) 16 - 35	

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

Molekylærbiologiske analyser av F_1 -hybriden viser at det er molekylær ekvivalens og identisk kopitall med de rekombinante DNA-innskuddene i de respektive foreldrelinjene. Søker konkluderer derfor med at er det svært sannsynlig de rekombinante innskuddene i hybridene er stabilt integrert i genomet. Videre vises det til at F_2 -generasjonen som høstes ikke skal inngå i videre foredlingsarbeid. Søker vurderer det derfor ikke nødvendig å undersøke stabilitet over generasjoner. Det vises også til at det er vist genetisk og fenotypisk stabilitet hos foreldrelinjene MON863 og NK603, og at agronomiske data knyttet til insektsresistens og herbicidtoleranse tilsier at de innsatte egenskapene er stabilt nedarvet.

2.4 Delkonklusjon

Hybriden MON863 x NK603 er dannet ved konvensjonelle kryssinger mellom de transgene maislinjene MON 863 og NK603. 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 Cry3Bb1- og CP4 EPSPS-proteiner i frø og vegetativt vev er sammenlignbare med uttrykket av tilsvarende proteinprodukter i foreldrelinjene.

3 Komparative analyser

3.1. Agronomiske karakterer

I henhold til søkers dokumentasjon er det foretatt registreringer av morfologiske og agronomiske parametere hos maishybrid MON863 x NK603, nær-isogen kontroll og totalt 13 kommersielle referansesorter (fire sorter pr. lokalitet) i feltforsøk på fire lokaliteter i Argentina vekstsesongen 2002-2003. Feltforsøkene viser små eller ingen signifikante forskjeller mellom den transgene maishybriden og umodifisert, nær-isogen kontroll med hensyn på karakterer som frøplantevitalitet, tidlighet (antall dager til blomstring og pollenspredning), plantehøyde, rotlegde, stiklegde, kolbehøyde, plantetetthet, plantebestandets beskaffenhet ("stay green"), frøavling og resistens mot ulike skadegjørere (sjukdom, insekter).

3.2. Delkonklusjon

Feltforsøk over en vekstsesong i Argentina viser små eller ingen signifikante forskjeller mellom den transgene maishybriden MON863 x NK603 og umodifisert, nær-isogen kontroll med hensyn på morfologiske og agronomiske karakterer.

4 Miljørisikovurdering

Søknad om godkjenning av maishybriden MON863x NK603 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 fôret 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 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 stedeegne eller introduserte viltvoksende arter i den europeiske flora som mais kan hybridisere med (OECD 2003).

Insektresistens og herbicidtoleranse 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 genmodifiserte maishybriden og konvensjonelle sorter med tilsvarende genetisk bakgrunn for disse karakterene. Det er ingen indikasjoner på at de introduserte egenskapene hos MON863 x NK603 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)

En mulig risiko knyttet til maishybrid MON863 x NK603 er utilsiktet horisontal spredning av *nptII*-transgenet til sykdomsfremkallende bakterier, og derav nedsatt terapieffekt ved enkelte infeksjoner i husdyrproduksjonen.

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 MON863 x NK603 skal kunne overføres til andre enn plantens naturlige kryssingspartnere (se utfyllende oversikt og vurdering i EFSA 2009; VKM 2005c).

Data fra eksperimentelle studier viser at genoverføring fra transgene planter til bakterier inntreffer svært sjelden, og at denne overføringen forutsetter sekvenshomologi mellom overført DNA og bakteriens genom (EFSA 2009; VKM 2005c).

En forutsetning for HGT fra genmodifiserte planter er at naturlig kompetente bakterier eksponeres til plantens DNA under naturlige forhold. Det er gjort en rekke ulike forsøk som ser på stabilitet av DNA i ulike mat- og førkilder samt opptak av dette fra tarmkanalen i ulike organismer (Rizzi et al. 2009). I et forsøk med mus ble stabilitet og opptak av DNA fra tarmkanalen av oralt tilført M13 DNA undersøkt. Det tilførte DNAet var sporbart i avføring opp til syv timer etter føring. 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 studier av 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 DNA fra GM soya i feces. Denne studien indikerte imidlertid at deler av *epsps*-transgenet hadde blitt tatt opp av tarmbakterier i forsøkspersonene før forsøket startet. Nielsen et al. (2000) og de Vries & Wackernagel (2002) har undersøkt persistens av DNA og opptak av rekombinant DNA i jord. I disse laboratorieforsøkene 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)

Positiv seleksjon er en forutsetning for at sjeldne HGT-begivenheter skal kunne etablerer seg i bakteriepopulasjoner tilstede i fordøyelseskanal og/eller miljøet (Pettersen et al. 2005, Townsend et al. 2012). For mange transgener er det ikke sannsynlig at HGT vil gi selektive fordeler eller økt fitness hos mottagerorganismen (Nielsen 2003). Transgener som gir resistens mot antibiotika kan forventes å gi vertsbakterien økt overlevelsessevne under visse miljøbetingelser. Slike betingelser kan være at bakterien er eksponert både for plantetransgener som gir resistens mot bestemte antibiotika, samt til det antibiotikumet som selekterer for en slik egenskap.

For plantetransgenet *nptII* som er til stede i MON863 x NK603 kan enkelte aminoglykosider (e.g. kanamycin og neomycin) positivt selektere for disse; forutsatt at plantetransgenet kan uttrykkes som et funksjonelt protein i den transformerte bakteriens cytoplasma. Aminoglykosidet neomycin, som *nptII*-genet gir resistens mot, benyttes i veterinærmedisin i Norge. Årlig oppdatert oversikt over forbruksdata for aminoglykosider i Norge utarbeides av NORM NORM-VET og kan finnes på Veterinærinstituttets hjemmesider (<http://www.vetinst.no/Publikasjoner/Norm-Vetrapporten>).

Neomycin benyttes i norsk veterinærmedisin i behandling av enteritt hos gris. I 2006 var forbruket av neomycin 29 kg virkestoff, mens det totale forbruket av antibiotika til landdyr i Norge var på ca 6,5 tonn virkestoff (NORM/NORM-VET 2006). En temporær positiv seleksjon av eventuelle bakterietransformanter i tarmkanalen hos dyr som behandles med slike antibiotika kan derfor ikke utelukkes. Det anses som usannsynlig at gener fra MON863 x NK603 vil etableres stabilt i genomet til mikroorganismer i miljøet eller i fordøyelseskanalen hos mennesker eller dyr uten et slikt seleksjonstrykk.

Ut fra tilgjengelig kunnskap er det ikke grunn til å forvente at det vil forekomme påvisbare horisontale genoverføringer av DNA-materiale fra MON863 x NK603 i mikrobiologiske prøver fra miljøet (Heinemann & Traavik 2004; Nielsen & Townsend 2004). Dette skyldes at slik overføring er forventet å være så lavfrekvent at de enten ikke forekommer i et gitt miljø og tidsperiode, eller at de forekommer ved så lav prevalens at de ikke kan påvises ved tilgjengelig metodologi (Heinemann & Traavik 2004; Nielsen & Townsend 2004). Det er tidligere påpekt store metodologiske utfordringer ved en slik påvisning (Heinemann & Traavik 2004; Nielsen & Townsend 2004; Townsend et al. 2012).

Antibiotikaene som *nptIII* gir resistens imot er klassifisert av European Medicines Agency (EMEA 2007) og WHO (2005) som "highly important" og "cannot be classified as of no or minor therapeutic relevance" og VKMs GMO-panel anser enhver økning av resistensnivået til disse antibiotikaene som uønsket. Risikoen knyttet til bruk av *nptIII*-genet i MON863 x NK603 kan derfor betraktes isolert sett i forhold til bruksområde til MON863 x NK603, eller som et element i en større vurdering av antibiotikaresistenssituasjonen der en samlet ønsker å begrense kilder og muligheter for utvikling av resistens i patogene bakteriepopulasjoner.

En så langt hypotetisk forekomst av HGT fra maishybrid MON863 x NK603 til bakterier som eksponeres for plantens DNA må sees i sammenheng med prevalensen av *nptIII*-genet i norsk miljø. Hvis *nptIII*-genet allerede finnes utbredt i miljø som vil eksponeres for MON863 x NK603, er det høyst usannsynlig at sjeldne HGT-begivenheter fra MON863 x NK603 vil endre resistensnivået.

Det er lite informasjon tilgjengelig om forekomst av *nptIII*-genet i relevante miljøet i Norge. Søker har heller ikke vedlagt slik informasjon. Overvåking av resistenssituasjonen i Norge (se årlig NORM/NORM-VET publikasjon) viser at forekomsten av aminoglykosidresistens og derav *nptIII*-genet er lav i patogene bakterier i Norge. Forekomst av kanamycin/neomycin-resistens er beskrevet i *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* og *Staphylococcus intermedius* fra svin, svinefaeces, kalkunfaeces, storfekjøtt, hund og hundefaeces i Norge. Forekomsten av resistente isolater varierte mellom 1 til 10 % (NORMVET rapportene 2004-2007). Imidlertid gir disse observasjonene ikke grunnlag for å bestemme hvilke resistensgener som forårsaker den fenotypiske resistensen i disse isolatene. Det understrekes at kunnskap om forekomsten av *nptIII*-genet i norske miljø er mangelfull.

EFSA og VKM har tidligere utredet problemstillingen rundt mulig HGT av antibiotikaresistensmarkørgener i detalj (EFSA 2004, 2009; VKM 2005c), og konkludert med at bidraget av *nptIII*-genet fra mat og fôr produsert fra genmodifiserte planter ikke er en signifikant kilde til resistensgener i bakterier som lever i tarmen hos mennesker og dyr. Konklusjonen var basert på lav sannsynlighet for HGT, samt et eksisterende nivå av *nptIII*-gener i miljøet. Den geografiske utbredelsen av antibiotikaresistens i Europa varierer mellom land og vurderingene gjort i disse tidligere publikasjonene er ikke basert på faktisk forekomst av *nptIII*-genet i Norge. Det foreligger ikke vitenskapelig litteratur som indikerer at forekomsten av *nptIII*-genet i Norge er utbredt.

4.2.2 Vertikal genoverføring

Tatt i betraktning det tiltenkte bruksområdet for maishybrid MON863 x NK603, vil potensialet for vertikal genspredning være begrenset til utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport, handtering og prosessering av maisen.

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. Insektsresistens og herbicidtoleranse 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 i Europa. Som for konvensjonelle sorter er det ingenting som tilsier at eventuelle spillplanter vil overleve til neste vekstsesong eller etablere uønskede populasjoner i Norge.

Eventuell krysspollinering mellom maishybrid MON863 x NK603 og konvensjonelt foredlete maissorter vil være betinget av frøspredning i forbindelse med transport og prosessering, påfølgende etablering og blomstring den transgene hybrididen. Det er imidlertid lite sannsynlig at eventuelle 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.

4.3 Potensiale for samspill mellom GMP og målorganismer

Maishybrididen MON863 x NK603 er transformert med *cry3Bb1*-genet fra jordbakterien *Bacillus thuringiensis*, subsp. *kumamotoensis*.

Cry3Bb1-proteinet, som uttrykkes 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'). *D. virgifera virgifera* er det eneste målinsektet for MON 863 som er påvist i Europa (Crop Protection Compendium 2007). Arten er en betydelig skadegjører i mais på det amerikanske kontinent, men ble først påvist i Europa (Serbia) i 1992. Den siste 15-årsperioden har arten etablert seg i flere land i Sentral-Europa, og det er også rapportert om funn av *D. virgifera virgifera* i Frankrike, Italia, Nederland og Storbritannia (Crop Protection Compendium 2007). Planteskadegjøreren har allerede medført betydelige avlingstap i enkelte regioner, og spredningen skjer svært raskt, spesielt i områder med intensiv maisdyrking. Insektet overvintrer i planterøttene, og områder med monokulturer av mais og arealer der det ikke praktiseres vekstskifte er spesielt utsatte. Det har ikke vært rapportert om funn av *D. virgifera virgifera* 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.

4.4 Potensiale for samspill mellom GMP og ikke-målorganismer

Sporadiske spillplanter av maishybrid MON863 x NK603 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 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.

4.5 Delkonklusjon

Risikoen for mulig spredning av *nptII*-genet fra MON863 x NK603 og derav nedsatt terapieffekt ved enkelte infeksjoner i husdyrproduksjon antas å være lav grunnet begrenset mulighet for positiv seleksjon av svært sjeldne HGT-begivenheter. Eventuell forekomst av slike HGT-begivenheter må sees i sammenheng med eksisterende prevalens av aminoglykosidresistens og *nptII*-genet i relevante norske miljø.

Det påpekes imidlertid at datagrunnlaget vedrørende forekomsten av *nptII*-genet i Norge er svært begrenset. Oppdaterte data fra NORM-NORM-VET-overvåkingen av resistenssituasjonen i Norge indikerer lav forekomst av *nptII*-genet. Den veterinære bruken av aminoglykosidet neomycin er slik at disse kan gi selektive fordeler for bakterie-transformanter som har tatt opp *nptII*-transgenet, hvis dette uttrykkes funksjonelt i bakterien.

Antibiotikaene som *nptII*-genet gir resistens imot er klassifisert av European Medicines Agency (EMA 2007) og WHO (2005) som «highly important».

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/UK/2004/06 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. Monsanto har derfor ikke utarbeidet spesifikke strategier for risikohåndtering eller en særskilt plan for overvåking av MON863 x NK603.

Tatt i betraktning tiltenkt bruksområde for MON863 x NK603 anser VKMs faggruppe for genmodifiserte organismer at det ikke er behov for å iverksette særskilt program for overvåking av maislinjen.

6 Kunnskapshull

- Det er kunnskapshull knyttet til forekomsten av *nptII*-genet i Norge og Europa.
- Det er kunnskapshull knyttet til i hvilken grad det er sammenheng mellom HGT-frekvenser og klinisk effekt av bakteriepopulasjoner som bærer nye HGT-eventer.

Konklusjon

Molekylær karakterisering

F₁-hybriden MON863 x NK603 er dannet ved konvensjonelle kryssinger mellom de transgene maislinjene MON 863 og NK603. 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 Cry3Bb1- og CP4 EPSPS-proteiner i frø og vegetativt vev er sammenlignbare med uttrykket av tilsvarende proteinprodukter i foreldrelinjene.

Komparative analyser

Feltforsøk over en vekstsesong i Argentina viser små eller ingen signifikante forskjeller mellom den transgene maishybriden MON863 x NK603 og umodifisert, nær-isogen kontroll med hensyn på morfologiske og agronomiske karakterer.

Antibiotikaresistens

Maishybriden MON863 x NK603 inneholder antibiotikas resistensmarkørgenet *nptII*. Faggruppen konkluderer med at risikoen for nedsatt terapieffekt ved enkelte infeksjoner i husdyrproduksjon forårsaket av spredning av *nptII*-genet fra maishybriden antas å være lav grunnet begrenset mulighet for positiv seleksjon av sjeldne HGT-begivenheter, samt at andre aminoglykosid-resistens determinanter finnes ved variabel prevalens i relevante bakteriepopulasjoner.

Det påpekes videre store forskjeller i geografisk utbredelse av antibiotikaresistens i Europa, og at det mangler publisert dokumentasjon på forekomsten av *nptII*-genet i Norge. Det foreligger ikke vitenskapelig litteratur som indikerer at forekomsten av *nptII*-genet i Norge er utbredt. Det påpekes også at neomycin benyttes i norsk landbruk, og at et seleksjonstrykk på eventuelle sjeldne transformanter derfor ikke kan utelukkes.

Øvrig miljørisiko

Søknad EFSA/GMO/UK/2004/06 gjelder godkjenning av maishybrid MON863 x NK603 til import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av maisen.

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 MON 863 x NK603 antas det ikke å være risiko for negative effekter på målorganismer, ikke-målorganismer (med mulig unntak av mikrober) eller på abiotisk miljø i Norge.

Samlet vurdering

Risikoen for nedsatt terapieffekt ved enkelte infeksjoner i husdyrproduksjon forårsaket av spredning av *nptII*-genet fra MON863 x NK603 antas å være lav grunnet begrenset mulighet for positiv seleksjon av sjeldne HGT begivenheter, samt at andre aminoglykosidresistens determinanter finnes ved variabel prevalens i relevante bakteriepopulasjoner.

Det påpekes store forskjeller i geografisk utbredelse av antibiotikaresistens i Europa, og at det mangler publisert dokumentasjon på forekomsten av *nptII*-genet i Norge. Det foreligger ikke vitenskapelig litteratur som indikerer at forekomsten av *nptII*-genet i Norge er utbredt. Det påpekes også at neomycin benyttes i norsk landbruk, og at et seleksjonstrykk på eventuelle sjeldne transformanter derfor ikke kan utelukkes.

VKMs faggruppe for genmodifiserte organismer finner det lite trolig at den omsøkte bruken av maislinje MON 863 x NK603 vil medføre endret risiko når det gjelder 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
- 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
- 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
- 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
- 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>
- EMEA (2007) Presence of the antibiotic resistance marker gene nptII in GM plants for food and feed uses. EMEA/CVMP/56937/2007
http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2010/01/WC500054091.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
- Nordgård L, Brusetti L, Raddadi N, Traavik T, Averhoff B, Nielsen KM (2012) An investigation of the potential of horizontal transfer of feed introduced DNA to the microbiota of the gastrointestinal tract of rats. *BMC Res. Notes* 5: 170
- 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 KM (2005) Modeling suggests frequency estimates are not informative for predicting the long-term effect of horizontal gene transfer in bacteria. *Environ. Biosafety Res* 4: 222–233 doi: 10.1051/ebr:2006008.
- 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 (2005a) Helserisikovurdering av genmodifisert mais MON863 x NK603 (EFSA/UK/2004/06). Uttalelse fra Faggruppen for genmodifisert organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet 8.4.2005.
- VKM (2005b) Helserisikovurdering av NK603 (C/EC/00/01) etter ny mat forordning 258/97/EF. Uttalelse fra Faggruppen for genmodifisert organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet 8.3.2005.
- VKM (2005c) 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 Monsanto's genmodifiserte mais MON863 (C/DE/02/9). Uttalelse fra Faggruppen for genmodifisert organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet 16.1.2006.

VKM (2008) Helse- og miljørisikovurdering av genmodifisert mais MON863 fra Monsanto Company (C/DE/02/9). Uttalelse fra Faggruppen for genmodifisert organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet 28.11.2008.

WHO (2007) Critically important antimicrobials for human medicine: Categorization for the development of risk management strategies to contain antimicrobial resistance due to nonhuman antimicrobial use. Report of the second WHO expert meeting, Copenhagen, 29-31 May 2007.