



Vitenskapskomiteen for mattrygghet
Norwegian Scientific Committee for Food Safety

Foreløpig helse- og miljørisikovurdering av genmodifisert maishybrid NK603 x T25 fra Monsanto Company (EFSA/GMO/NL/2010/80)

Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer i
Vitenskapskomiteen for mattrygghet

Innspill til EFSA's GMO Extranet

Dato: 12.1.2011

Dok. nr.: 11- 303- endelig

ISBN: 978-82-8259-026-6

VKM Report 2011: 02



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

Koordinatorer fra sekretariatet

Arne Mikalsen og Merethe Aasmo Finne

Sammendrag

Helse- og miljørisikovurderingen av den herbicidtolerante maislinjen NK603 x T25 (EFSA/GMO/NL/2010/80) fra Bayer CropScience er utført av Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM). VKM er bedt av Mattilsynet om å vurdere helse- og landbruksrelatert miljørisiko ved en eventuell godkjenning av maislinje NK603 x T25 for alle bruksområder, unntatt dyrking. Foreldrelinjene NK603 og T25 er tidligere vurdert av Faggruppe for genmodifiserte organismer i henholdsvis 2005, 2007, 2008 og 2009 (VKM 2005a, 2007 a,b, 2008, 2009).

Vurderingen av den genmodifiserte maishybriden er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSA's nettside EFSA GMO Extranet. I tillegg er det benyttet informasjon fra uavhengige vitenskapelige publikasjoner i vurderingen.

Maishybriden NK603 x T25 er risikovurdert i henhold til tiltenkt bruk i EU/EØS-området, og i overensstemmelse med miljø- og helsekravene i matloven, samt kravene i EU-forordning (EF) Nr. 1829/2003. Videre er prinsippene i EFSA's retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter og avledete næringsmidler (EFSA 2006a) og Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) konsensusdokument for mais (OECD 2002) lagt til grunn for vurderingen.

Den vitenskapelige vurderingen omfatter transformasjonsprosess, vektor, transgene konstrukt, uttrykk og nedarving av genkonstruksjonen, komparativ analyse av ernæringsmessig kvalitet, mineraler, vitaminer, fettsyresammensetning, kritiske toksiner, metabolitter, antinæringsstoffer, allergener og nye proteiner. Videre er agronomiske egenskaper, potensialet for ikke tilsiktede effekter på fitness, samt mulig horisontal og vertikal genoverføring 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.

F₁-hybriden NK603 x T25 er fremkommet ved konvensjonelle kryssinger mellom de transgene maislinjene NK603 og T25.

Foreldrelinjen NK603 uttrykker CP4-EPSPS-proteiner, som er resultat av introduksjon av *cp4-epsps*-genet fra jordbakterien *Agrobacterium tumefaciens*. Genet koder for enzymet 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfatsyntetase, som omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfat, en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. 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.

Foreldrelinjen T25 har fått innsatt en genkonstruksjon med en enkeltkopi av *pat*-genet fra jordbakterien *Streptomyces viridochromogenes*. Genet koder for enzymet fosfinotricin acetyltransferase (PAT), som acetylerer og inaktiverer glufosinat-ammonium, virkestoffet i fosfinotricin-herbicider av typen Finale. Fosfinotricin er et ikke-selektivt kontaktherbicid som hemmer glutaminsyntetase. Enzymet deltar i assimilasjonen av nitrogen og katalyserer omdanning av glutamat og ammonium til aminosyren glutamin. Hemming av glutaminsyntetase fører til akkumulasjon av ammoniakk, og til celledød i planten. T25 plantene vil derfor tolerere høyere doser av sprøytemiddelet glufosinat sammenlignet med konkurrerende ugras. T25 inneholder en delvis deletert, trunkert og ikke funksjonell versjon av *β-lactamase (ampR)*-genet, som ikke uttrykkes i maisplantene.

Komparative analyser

Analysen av ernæringsmessige komponenter er i hovedsak utført i tråd med OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002). Det er påvist signifikante forskjeller mellom maisen

NK603 x T25 og kontroll i enkeltparametere. Verdiene for de analyserte komponentene ligger imidlertid innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen, samt innenfor toleranseintervallene for de umodifiserte referansesortene som er inkludert i søkers dokumentasjon.

Faggruppen påpeker at søker ikke har foretatt analyser av vitamin C og furfural. Det understrekes at konsensusdokumentet i størst mulig grad skal følges når det legges fram dokumentasjon på nivåene av næringsstoffer, antinæringsstoffer og metabolitter.

Faggruppen vektlegger at hoveddelen av maisforbruket i Norge er som dyrefôr og at mais til humant konsum utgjør mindre enn 1 % av energiinntaket både for voksne og barn under ett år. Daglig inntak av sukkermais vil bidra med 0,5 % av daglig anbefaling for vitamin C ved inntak lik medianen (data fra Den Norske mor barn studien). Ved maisinntak på 17,5 g/dag (97,5 % persentilen) vil ca 2,6 % av daglig anbefaling for vitamin C dekkes. Når det gjelder dyrefôr ansees det naturlige vitamininnholdet i mais å være uten betydning da all mais som benyttes som fôr vitaminberikes i henhold til Mattilsynets anbefalinger. Tilsvarende angis krav til ernæringsmessig sammensetning av kornbasert barnemat i vedlegg 1 i Forskrift om bearbeidet kornbasert barnemat og annen barnemat til spedbarn og småbarn (FOR 2002-10-18 nr 1185). Faggruppen vurderer derfor at et eventuelt avvikende nivå av vitamin C i NK603 x T25 har liten ernæringsmessig betydning i Norge.

Feltforsøk over en vekstsesong viser ingen signifikante forskjeller mellom NK603 x T25 og umodifisert kontroll med hensyn på fenotypiske og agronomiske karakterer.

Toksisitet og allergenisitet

CP4 EPSPS- og PAT-proteinene som uttrykkes som følge av genmodifiseringen, har ingen likheter med kjente toksiner og allergener, eller egenskaper som tilsier at det vil virke som et allergen eller toksin. Innholdet av disse proteinene i korn er ca 0,01 % av totalt protein, og utgjør således en svært liten del av det totale proteininnholdet. Faggruppen finner det lite sannsynlig at eksponering av CP4 EPSPS- og PAT-proteinene i seg selv og i de mengder som tilføres via genmodifisert mais er helsemessig betenkelig. Akutte 14-dagers fôringsstudier (oral sondefôring) på mus med bakterieframstilt CP4 EPSPS- og PAT-proteiner viste ingen negative helseeffekter. Videre konkluderer ernæringsstudier med broilere at maishybriden NK603 x T25 er ernæringsmessig lik umodifisert mais.

Resultater fra sub-kroniske fôringsforsøk på rotter som er dokumentert i andre søknader, viser ingen skadelige helseeffekter ved fôring med fôr som inneholder NK603 og T25.

Landbruksrelatert miljørisiko

Søknaden gjelder godkjenning av maishybriden NK603 x T25 for import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av maishybriden. Med bakgrunn i tiltenkt bruksområde er miljørisikovurderingen avgrenset til mulige effekter av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport og prosessering, samt indirekte eksponering gjennom gjødsel fra husdyr føret med genmodifisert mais. Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av maishybriden i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Norge er i utkanten av dyrkingsområdet for mais, dyrkingsomfanget er svært begrenset og det er ingen stedeagne eller introduserte viltvoksende arter som mais kan hybridisere med.

Nøkkelord

Mais, *Zea mays* L., genmodifisert maishybrid NK603 x T25, EFSA/GMO/NL/2010/80), herbicidtoleranse, CP4 EPSPS, glyfosat, PAT, glufosinat-ammonium, helsemessig trygghet, helse, landbruksrelatert miljørisiko, forordning 1829/2003/EF

Forkortelser og ordforklaringer

| | |
|------------------|--|
| ALS | Acetolactatsyntase-enzym |
| AMPA | Aminomethylphosphonic acid, nedbrytningsprodukt fra glyfosat. |
| 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 eliminerer 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 |
| 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. |
| CTP | Kloroplasttransittpeptid |
| DN | Direktoratet for naturforvaltning |
| DNA | Deoxyribonukleinsyre (DNA) |
| EFSA | European Food Safety Authority |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| EPSPS | 5-enolpyruvylsukinat-3-fosfat-syntetase |
| FAO | Food and Agriculture Organization, FNs 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. |
| GAT | Glyfosatacetyltransferase-enzym |
| GLP | Good Laboratory Practices, retningslinjer for godt laboratoriearbeid. |
| Glyfosat | Bredspektret herbicid |
| GMO | Genmodifisert organisme |
| GMP | Genmodifisert plante |
| Herbicid | Ugrasmiddel |
| Locus | Spesifikk posisjon på kromosomet der et gen er lokalisert. |
| MALDITOF | Massespektrometrimetode for å måle molekylvekt til peptider. |
| MT | Mattilsynet |
| NDF | Neutral detergent fiber, dvs. fiberfraksjon som inneholder hemicellulose og ADF. |
| Northern blot | Teknikk for overføring av RNA til en membran for videre studier av overførte RNA-sekvenser. |
| Nucosulfuron | Smalspektret herbicid, hemmer ALS enzymer |
| Nær-isogen linje | Linjer eller sorter som er genetisk identiske, med unntak av ett locus eller kromosomsegment. |
| OECD | Organisation for Economic Co-operation and Development |
| ORF | Open Reading Frame (åpen leseramme) |
| <i>pat</i> | DNA-sekvens fra jordbakterien <i>Streptomyces viridochromogenes</i> , koder for enzymet fosfotricin acetyltransferase (PAT), som acetylerer og inaktiverer glufosinat-ammonium, |

| | |
|-----------------------------|--|
| PCR | Polymerase chain reaction. Polymerase kjedereaksjon. Metode for å syntetisere mange kopier av en DNA-sekvens vha. primere. |
| Rimsulfuron | Smalspektret herbicid, hemmer ALS enzymer. |
| RNA | Ribonukleinsyre |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat (SDS)-polyakrylamidelektroforese. Elektroforetisk metode for separasjon av proteiner. |
| Southern blot | Teknikk for overføring av DNA til en membran for videre studier av overførte DNA-sekvenser. |
| T-DNA | DNA fra Ti-plasmidet fra 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-plamidet som overføres og gjør at resten av vektoren ikke blir satt inn i plantekromosomene. |
| 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. |
| ZM-HRA | ZM står for <i>Zea mays</i> , og HRA er et acetolaktatenzym fra mais. Enzymet er blitt endret ved at to aminosyrer er byttet ut. Enzymet er tolerant for herbicider som hemmer ALS-enzymet. |

Innholdsfortegnelse

| | |
|---|-----------|
| Bidragstere | 2 |
| Sammendrag | 3 |
| Nøkkelord | 4 |
| Forkortelser og ordforklaringer | 5 |
| Innholdsfortegnelse | 7 |
| Bakgrunn | 8 |
| Oppdrag fra Mattilsynet | 9 |
| Risikovurdering | 11 |
| 1 Innledning | 11 |
| 1.1 Beskrivelse av egenskap(er) og virkningsmekanismer | 11 |
| 2 Molekylær karakterisering | 12 |
| 2.1 Hybridproduksjon | 12 |
| 2.2 Evaluering av foreldrelinjer | 12 |
| 2.3 Hybrid NK603 x T25 | 19 |
| 3 Komparative analyser | 22 |
| 3.1 Valg av komparator og forsøksdesign..... | 22 |
| 3.2 Analyser av ernæringsmessige komponenter | 22 |
| 3.3 Agronomiske karakterer..... | 29 |
| 3.4 Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag | 32 |
| 4 Dokumentasjon av toksisitet og allergenisitet | 32 |
| 4.1 Toksisitet..... | 32 |
| 4.2 Allergenisitet..... | 33 |
| 4.3 Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag | 33 |
| 5 Miljørisikovurdering | 34 |
| 5.1 Potensiale for utilsiktede effekter på fitness relatert til genmodifiseringen | 34 |
| 5.2 Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag | 36 |
| 6 Vurdering av søkers dokumentasjon | 37 |
| 7 Innspill til EFSA GMO Extranet søknad EFSA/GMO/NL/2010/80 | 37 |
| Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag | 38 |

Bakgrunn

Vitenskapskomiteen for mattrygghet er bedt av Mattilsynet om å foreta en utredning av helse- og landbruksrelatert miljørisiko ved en eventuell godkjenning av den genmodifiserte maishybriden NK603 x T25 fra Monsanto Company (Monsanto Europe S.A.) (EFSA/GMO/NL/2010/80). Maishybriden er søkt omsatt i EU/EØS-området under Forordning (EF) No. 1829/2003 om genmodifiserte næringsmidler og fôrvarer (artiklene 3(1) og 15(1)). Søknaden omfatter bruksområdene import, prosessering, næringsmidler og fôrvarer, men inkluderer ikke dyrking.

Søknaden ble fremmet og anbefalt av nederlandske myndigheter i oktober 2010. Dokumentasjonen knyttet til søknaden ble lagt ut på EFSA's GMO Extranet 12. oktober 2010, med frist på 90-dager for innspill fra EU- og EØS/EFTA-landene. Norge har ikke tidligere uttalt seg om NK603 x T25.

NK603

Foreldrelinjen NK603 ble godkjent for bruksområdene import, prosessering, mat og fôr i 2004 og 2005 under henholdsvis direktiv 2001/18/EF og Novel Foodsforordningen (EF.) Nr. 258/97. Linjen ble videre notifisert som eksisterende produkt under forordning 1829/2003/EF i 2004. Godkjenningen av NK603 gikk ut i april 2007, og Monsanto har søkt om fornyet godkjenning fram til 2017 (EFSA-GMO-RX-NK603). Det er også søkt om godkjenning av NK603 for dyrking og frøavl under forordning 1829/2003/EF (søknad EFSA/GMO/NL/2005/22). I mai 2009 publiserte EFSA en felles risikovurdering for begge disse søknadene (EFSA 2009b). I tillegg foreligger det søknader om godkjenning av hybrider der en eller flere av foreldrelinjene inngår.

NK603 er tidligere vurdert av VKMs Faggruppe for genmodifiserte organismer med hensyn på helserisiko knyttet til bruk av maislinjen som næringsmiddel og fôrvare (VKM 2005a).

T25

Foreldrelinjen T25 ble godkjent som genmodifisert organisme i EU under det tidligere utsetningsdirektivet (direktiv 90/220/EF), med bruksområder dyrking, frøavl, import, videreforedling, mat og fôr. Søknaden ble anbefalt og fremmet av franske myndigheter, og sendt på høring til EØS-landene i mai 1996, med frist på 60 dager for kommentarer og innspill. EUs tidligere Vitenskapskomité for planter ('Scientific Committee on Plants') ga sin uttalelse til søknaden i februar 1998, og en oppdatert vurdering 20. juli 2001. Godkjenning for omsetning av maislinje T25 ble gitt 22. april 1998, og omfattet både den genmodifiserte maislinjen, og alle avledete sorter (innavla linjer, hybrider) produsert ved hjelp av konvensjonell foredlingsmetodikk.

Maislinjen er også godkjent under den forenklede prosedyren i Novel Foodsforordningen (EF) Nr. 258/97 til bruk som avledete næringsmidler og næringsmiddelingsredienser. Den er videre notifisert som eksisterende produkt under forordning 1829/2003/EF, artikkel 8 og 20, med bruksområder prosesserte næringsmidler, tilsetningsstoffer til næringsmidler, fôrvarer (både i prosessert form og som levende organisme), samt tilsetningsstoffer til fôr.

Flere medlemsland har nedlagt nasjonale forbud mot utsetting av maislinjen T25 i henhold til den såkalte sikkerhetsklausulen i direktiv 2001/18/EF, Art. 23. I den forbindelse har EFSA's GMO-panel levert nye risikovurderinger av maislinjen (EFSA 2004b; 2006b).

Godkjenningen av T25 gikk ut 18. april 2007, og Bayer CropScience har levert to søknader om fornyet godkjenning under Forordning (EF) No. 1829/2003 om genmodifiserte næringsmidler og fôrvarer (artiklene 3(1) og 15(1)) (EFSA/GMO/NL/2007/46 og EFSA/GMO/RX-T25). Søknadene, som omfatter bruksområdene import, videreprosessering, næringsmidler, fôrvarer og dyrking, var på offentlig høring i 2008, og er nå under behandling i EU. Fôrmaissorten "LLChardon" er den eneste avledete sorten fra T25 som er registrert i nasjonale sortslister i Europa (CERA 2010). Oppføring av andre hybridsorter av T25 er foreløpig avsluttet i Europa.

I Norge ble maislinjen T25 første gang vurdert av Nasjonalt folkehelseinstitutt i 1996 med hensyn på risiko for allergi, effekter ved direkte håndtering, bruk som næringsmiddel og miljømessige forhold av helsemessig betydning. I forbindelse med nasjonal sluttbehandling av søknad om godkjenning av T25 som annen mais under direktiv 90/220/EF, vurderte VKMs Faggruppe for genmodifiserte organismer helse- og miljøaspekter knyttet til dyrking og bruk av maislinjen som næringsmiddel og fôrvarer i 2007 (VKM 2007 a,b). I forbindelse med EFSAAs offentlige høringer av fornyelsessøknadene i 2008, vurderte VKM maislinjen på nytt med hensyn på helse- og miljørisiko (VKM 2008,2009).

Status i Norge

I Norge ble foreldrelinjene NK603 og T25 innmeldt som prosesserte fôrvarer under den nasjonale overgangsordningen for eksisterende GM-produkter 15. mars 2006 (jfr. fôrvarerforskriftens § 7a), og var i utgangspunktet tillatt å omsette på det norske markedet fram til 15. september 2008. På bakgrunn av at implementeringen av EUs GM-regelverk har tatt lengre tid enn antatt, har Mattilsynet vedtatt å forlenge dispensasjonen om krav til godkjenning fram til 15. september 2010. Notifiseringene omfatter kun prosesserte, ikke spiredyktige fôrvarer til oppdrettsfisk, og dispensasjonen er gitt til fire fiskefôrprodusenter. Overgangsordningen omfatter ikke husdyrfôr http://www.mattilsynet.no/for/dispensasjon_fra_godkjenningskrav_i_f_oirc_rvareforskriften_73820

I juni 2008 anbefalte Direktoratet for naturforvaltning Miljøverndepartementet å godkjenne både NK603 og T25 for omsetning som mat og fôr på det norske markedet. Saken ligger fortsatt til behandling i departementet.

Status utenfor EØS-området

Utenfor EØS-området er NK603 x T25 godkjent for kommersiell dyrking, og bruk som mat og fôr i USA og Japan (CERA 2010; EFSA/GMO/NL/2010/80). I tillegg opplyser Monsanto Company at søknader om godkjenning NK603 x T25 for ulike bruksområder er under forberedelse i Canada, Mexico, Colombia, Taiwan, Sør-Korea og Filippinene.

Oppdrag fra Mattilsynet

Mattilsynet har i brev datert 15.10.2010 (ref. 2010/195445) gitt Vitenskapskomiteen for mattrygghet i oppdrag å foreta løpende vitenskapelige vurderinger av helserisiko av genmodifiserte organismer til bruk som mat og fôr, samt avledete, prosesserte ikke-spiredyktige næringsmidler og fôrvarer som søkes godkjent under EUs forordning 1829/2003/EF. VKM er videre bedt om å vurdere landbruksrelatert miljørisiko for genmodifiserte planter som søkes godkjent under forordning 1829/2003/EF. Avhengig av hvilket bruksområde de genmodifiserte plantene søkes godkjent for, gjelder oppdraget miljørisiko knyttet til import, transport, videreforedling/prosessering og dyrking.

For nevnte søknader skal VKM, uten særskilt oppdrag, gi innspill til EFSA GMO EXTRANet når sakene er på offentlig høring (første innspillrunde). Kopi av innspill sendes Mattilsynet. Dersom det ikke gis innspill til søknadene orienterer også VKM Mattilsynet om dette. VKM skal følge opp EFSAAs behandling av innspillene og vurdere EFSAAs endelige risikovurdering (EFSAAs opinion). VKM skal sende sin vurdering av EFSAAs opinion til Mattilsynet med kopi til Direktoratet for naturforvaltning.

Søknad EFSA/GMO/NL/2010/80, genmodifisert maishybrid NK603 x T25, ble lagt ut på EFSAAs GMO Extranet 12. oktober 2010. Faggruppe for genmodifiserte organismer skal, i tråd med oppdragbrev, utarbeide en helse- og miljørisikovurdering av maisen til import og industriell prosessering, samt til bruk som næringsmiddel og fôrvarer. Søknaden omfatter ikke dyrking. Vurderingen skal utføres i henhold til tiltenkt bruk og i overensstemmelse med prinsippene som er nedfelt i EFSAAs retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter ("Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed") (EFSA 2006a).

Produktet som ønskes vurdert:

Genmodifisert maislinje NK603 x T25 fra Monsanto Company (EFSA/GMO/NL/2010/80)

Unik kode: MON-ØØ6Ø3-6 x ACS-ZMØØ3-2

Status i EU: Søknad under forordning 1829/2003/EF.

Frist for innspill til EFSA's GMO Extranet: 12. januar 2011

Ønsket svarfrist til Mattilsynet: 10. januar 2011.

Risikovurdering

1 Innledning

Helse- og miljørisikovurderingen av den genmodifiserte maishybriden NK603 x T25 er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSAs nettside EFSA GMO Extranet. I tillegg er det benyttet uavhengige vitenskapelige publikasjoner med referee i vurderingen.

Maishybriden NK603 x T25 er risikovurdert i henhold til tiltenkt bruk i EU/EØS-området, og i overensstemmelse med miljø- og helsekravene i matloven, samt kravene i EU-forordning (EF) Nr. 1829/2003.

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

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

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

1.1 Beskrivelse av egenskap(er) og virkningsmekanismer

Maishybriden NK603 x T25 er dannet ved tradisjonell kryssingsforedling mellom to innavlede linjer, avledet av de genmodifiserte maislinjene NK603 og T25. Den genmodifiserte foreldrelinjen T25 er utviklet for å gi toleranse for herbicidet glufosinat-ammonium. Bakgrunnen for toleransen er introduksjon av *pat*-genet, som er isolert fra jordbakterien *Streptomyces viridochromogenes*, og som koder for enzymet fosfinotricin acetyltransferase (PAT). Enzymet acetylerer og inaktiverer glufosinat-ammonium, som er virkestoff i fosfinotricin-herbicer av typen Finale og Basta. *Pat*-genet er syntetisk i den forstand at det har en endret nukleotidkode sammenlignet med bakterien (70 % identisk). Dette er gjort for å redusere GC innholdet, som søker hevder er lavere i planter, samtidig som en beholder aminosyrekoden.

Herbicer som er basert på glufosinat-ammonium gir en irreversibel hemming av plantenes eget enzym glutaminsyntetase. Enzymet deltar i assimilasjonen av nitrogen og katalyserer omdanning av glutamat og ammonium til aminosyren glutamin. Ved sprøyting med fosfinotricin-herbicer vil inkorporeringen av nitrogen i planten blokkeres, og planten vil normalt dø etter kort tid på grunn av akkumulering av ammonium til et nivå som er toksisk for plantene. Når det introduserte *pat*-genet uttrykkes i de transgene maisplantene vil det aktive stoffet acetyleres og plantenes eget enzym glutaminsyntetase vil ikke inhiberes. Syntesen av glutamat og detoksifiseringen av ammonium går derfor som normalt, og de transgene plantene vil derfor tolerere høyere doser av glufosinat sammenlignet med konkurrerende ugras.

Foreldrelinjen NK603 uttrykker CP4-EPSPS-proteiner, som er resultat av introduksjon av *cp4-epsps*-genet fra jordbakterien *Agrobacterium tumefaciens*. Genet koder for enzymet 5-enolpyruvylsikimat-3-

fosfatsyntetase, som omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfat, en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. Enzymet finnes hos alle planter og mikroorganismer, men ikke hos dyr. 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 hybriden NK603 x T25 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom maislinjene NK603 og T25.

2.2 Evaluering av foreldrelinjer

2.2.1 Maislinje 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 ekspresjonskassetter 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 ekspresjonskassetten 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 fôrmais. Innsatte gener og regulatoriske elementer i fragmenter er beskrevet i tabell 1 og 2, og vist i figur 1.

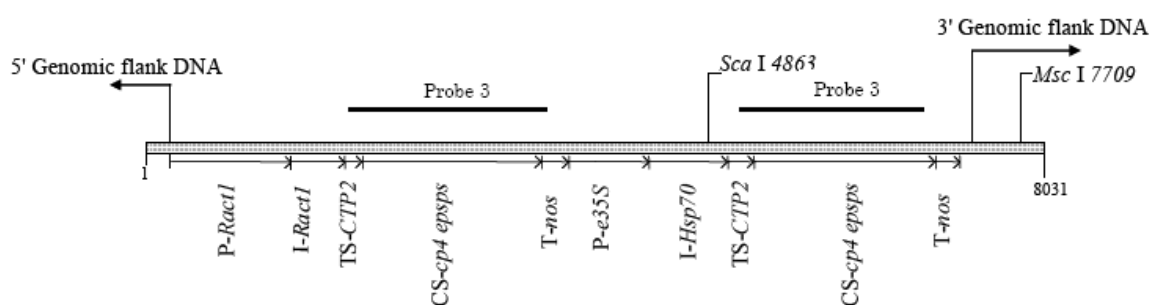
Tabell 1. Beskrivelse av innsatte gener og regulatoriske elementer i NK603

| 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 5- <i>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 5- <i>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. |

Tabell 2. Størrelsesfordeling av gener og regulatoriske elementer i NK603.

| Genetic element | Source | Size (kb) | Function |
|------------------------------------|-------------------------------------|-----------|---|
| <i>cp4 epsps</i> gene cassette (1) | | | |
| <i>P-ract1/ract1</i> intron | <i>Oryza sativa</i> | 1.4 | 5' region of the rice actin 1 gene containing the promoter, transcription start site and first intron |
| <i>ctp 2</i> | <i>Arabidopsis thaliana</i> | 0.2 | DNA sequence from chloroplast transit peptide, isolated from <i>Arabidopsis thaliana</i> EPSPS, present to direct the CP4 EPSPS protein to the chloroplast, the site of aromatic acid synthesis |
| <i>cp4 epsps</i> | <i>Agrobacterium</i> sp. strain CP4 | 1.4 | The DNA sequence for CP4 EPSPS, isolated from <i>Agrobacterium</i> sp. strain CP4, which imparts tolerance to glyphosate |
| NOS 3' | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 0.3 | A 3' nontranslated region of the nopaline synthase gene from <i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA which ends transcription and directs polyadenylation of the mRNA |
| <i>cp4 epsps</i> gene cassette (2) | | | |
| <i>e35S</i> | Cauliflower mosaic virus | 0.6 | The cauliflower mosaic virus (CaMV) promoter with the duplicated enhancer region |
| <i>Zmhsp70</i> | <i>Zea mays</i> | 0.8 | Intron from the maize <i>hsp70</i> gene (heat-shock protein) present to stabilize the level of gene transcription |
| <i>ctp 2</i> | <i>Arabidopsis thaliana</i> | 0.2 | DNA sequence from chloroplast transit peptide, isolated from <i>Arabidopsis thaliana</i> EPSPS, present to direct the CP4 EPSPS protein to the chloroplast, the site of aromatic acid synthesis |
| <i>cp4 epsps</i> | <i>Agrobacterium</i> sp. strain CP4 | 1.4 | The DNA sequence for CP4 EPSPS, isolated from <i>Agrobacterium</i> sp. strain CP4, which imparts tolerance to glyphosate |
| NOS 3' | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 0.3 | A 3' nontranslated region of the nopaline synthase gene from <i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA which ends transcription and directs polyadenylation of the mRNA |



Figur 1. Rekombinant DNA fragment fra mais-NK603 som er integrert i NK603 x T25 genomet.

Karakterisering av geninnsettingen

Molekylærbiologisk analyse 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.

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 EPSPSI214p er undersøkt med røntgenkrystallanalyse, variabel løkkestruktur i proteinet som inneholder det nye prolinet, og domenet som inneholder det nye prolinet. Disse analysene viser at CP4 EPSPS I214p-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 selvpollineringsgenerasjon 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 2005a). Faggruppen konkluderer med at karakteriseringene av det rekombinante innskuddet i NK603 er tilfredsstillende.

2.2.2 Maislinje T25

Transformasjonsprosess og vektorkonstruksjon

Maislinjen T25 har fått overført et syntetisk *pat*-gen, derivert fra *Streptomyces viridochromogenes* stamme Tü 494. Transformeringen er gjort ved direkte DNA/plasmid opptak til protoplastkulturer (cellekulturer hvor plantenes cellevegger er fjernet) ved å perforere maiscellers cellemembraner vha polyethylenglycol (PEG) som muliggjør overføring av genetisk materiale (Mórocz *et al.* 1990).

P35S promoteren binder RNA polymerase og initierer transkripsjon, men uttrykkes ikke som RNA eller protein. *T35S* terminerer transkripsjonen, men uttrykkes ikke i endelig mRNA eller protein (Franck *et al.* 1980). *ori-pUC* området er replikasjonsgenet for pUC plasmidet, og dets funksjon er at plasmidet kan replikeres i *E. coli*. Replikasjon fra dette origo er begrenset til Enterobakterier og fungerer ikke i eukaryote celler. *β-lactamase* - vektoren inneholder et ampicillin resistensgen, som gir resistens mot beta-lactam antibiotika (penicillin, ampicillin, etc). Genene uttrykkes ikke i maisplanten T25 og genproduktet er ikke til stede (Eckes 1994; van Wert 1994). *Pat* genet er opprinnelig isolert fra *Streptomyces viridochromogenes* (Hara *et al.* 1991). Genet har to funksjoner i den genmodifiserte organismen. Det fungerer både som selektiv markør, som gjør at en kan skille transgene celler fra ikke transgene i vevskulturen under regenerering av transgene linjer, og gir de transformerte plantene en økt toleranse mot fosfinitrcin-herbicer.

Tabell 3. Beskrivelse av gener og regulatoriske elementer brukt i transformering av T25.

| <i>Genetiske elementer fra pUC/Ac brukt til transformering av T25</i> | |
|---|--|
| <i>pUC18</i> 1747-411, 2,63 kb ¹ | Vektor som bærer DNAet en ønsker å overføre til maisen ved vektortransformering/ genmodifisering. Vanlig høykopi <i>E. coli</i> -plasmid brukt til kloning av DNA |
| <i>ori-pUC</i> | Replikasjonsorigo som dirigerer replikasjon av plasmidet i <i>E. coli</i> som del av oppgitt vektor. |
| <i>β-lactamase</i> | Trunkert gen for ampicillinresistens ved uttrykk av <i>β-lactamase</i> fra <i>E. coli</i> . Genet skal bare uttrykkes i bakterier fra en prokaryot promoter. Fragmentet er en del av tidligere oppgitt vektor. |
| <i>P-e35S</i> | Blomkålmosaikkvirus (<i>CaMV</i>) promoter fra vektor pDH51 |
| <i>Pat</i> | Et syntetisk <i>pat</i> (Glufosinat) resistensgen fra <i>Streptomyces viridochromogenes</i> |
| <i>T-35S</i> | 3' terminator delen av <i>35S</i> genet, DNA- sekvens fra <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Avslutter transkripsjonen. Uttrykkes ikke i planten |

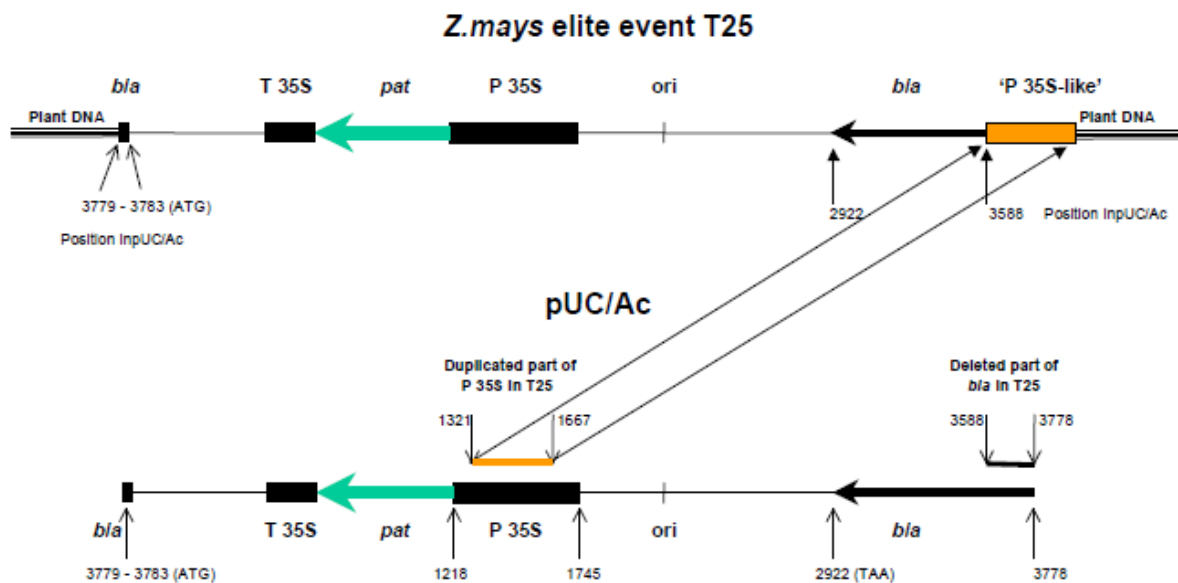
- 1) Under innsettingen skjer en rearrangering slik at det totale insertet er 4590bp, hvorav 4122 bp stammer fra plasmidet og to små fragmenter stammer fra DNA fra mais (Collonnier *et al.* 2005).

Karakterisering av geninnsettingen og genkonstruksjonen

Den genmodifiserte maislinjen T25 uttrykker *pat* genet fra *Streptomyces viridochromogenes* stamme Tü 494. Hele plasmidet er sekvensert og er godt karakterisert. Insertet har vist seg å bli stabilt nedarvet. Opprinnelig informasjon og beskrivelse av transgener innsatt i T25 er korrigert i fornyet søknad om markedsføring av T25 for perioden 2007 til 2017. Informasjon fra begge søknadene er inkludert i risikovurderingen.

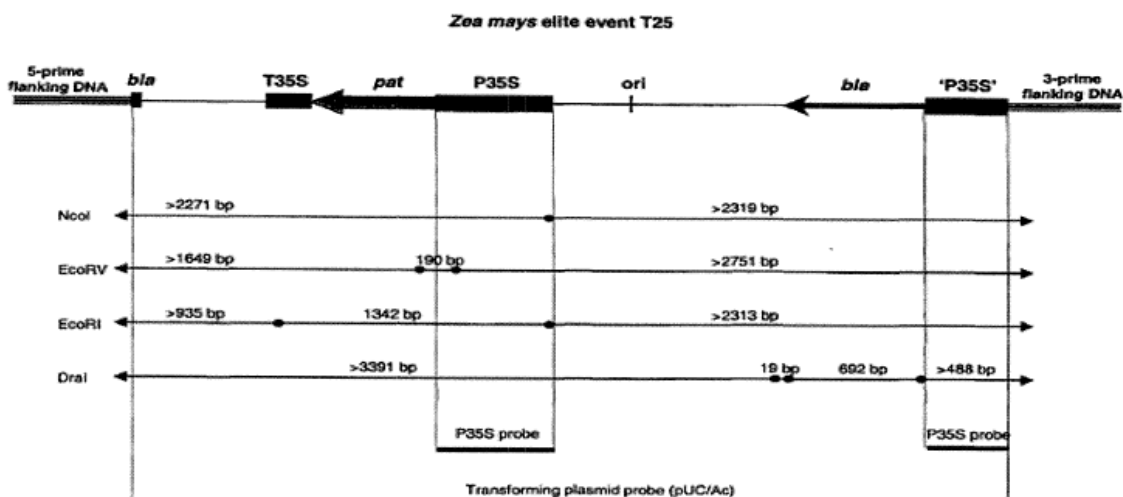
I fornyet søknad brukes Southern blot og PCR-resultater som dokumentasjon fra Bayer CropScience for å beskrive den innsatt genkonstruksjon i GM planten. Southern blot hybridisering indikerer at bare en kopi av *pat*-genet er integrert i maisgenomet. Videre analyser av GM-planten viser at insertet består av P35S-*pat*-T35S ekspresjonskassetten og ved 3'-enden et fragment som består av deler av P35S promoteren lenket til et fragment av *ampR*-genet. Dette *ampR*-fragmentet består av sekvenser fra bp 80 til bp 433 fra P35S, samt sekvenser fra bp 196 til bp 861 fra *ampR*-genet. De første 5 bp av *ampR*-genet, som inneholder ATG transkripsjonstartkondon er satt inn i 5'-enden av insertet (se figur 2) PCR-data indikerer at pUC/Ac-sekvenser, fra bp 3814 til 3555 har blitt integrert i maisgenomet (se figur 2). Sekvenser fra bp 3588 til bp 3778 er i henhold til Bayer CropScience ikke integrert i maisgenomet. I henhold til Bayer CropScience betyr dette at ca. 25 % av 5'-enden til *ampR*-genet mangler i insertet (figur 2). Nyere PCR- og sekvenseringsanalyser, fra 2002, viser at dette insertet har vært til stede i de tidligste T25-plantene. Ny informasjon i ny søknad fra 2007 viser også vha Southern hybridisering at det er to kopier av 35S promoter i T25, og at den andre kopien ligger foran *β-lactamase* genet (figur 2). Det hevdes likevel å ikke ha noen funksjonell betydning. Resistensgenet er ufullstendig pga en delesjon og gir ikke noe funksjonelt genprodukt. I respons til kommentarer på notifiseringen hevder søker at det er ett *pat* gen integrert i T25, siden egenskapen nedarves som en mendelsk karakter. Dette er ikke tilstrekkelig dokumentasjon, da det typisk innsettes flere kopier av transgenkonstrukt i såkalte hotspots i genomer etter transformering (Kohli *et al.* 1998). Det en kan

hevde ut fra denne nedarvingen er at transgenet eller transgenene er integrert i et locus, eller sitter forholdsvis tett sammen på genomet.



Figur 2. Rekombinant DNA fragment fra mais-T25 som er integrert i NK603 x T25 genomet, samt skjematisert tegning av plasmidet pUC/Ac.

I den fornyede søknaden er det lagt ved dokumentasjon på undersøkelser av fravær av andre pUC/AC-plasmidsekvenser i maisgenomet. Undersøkelsene er utført ved Southern-blot med P35S- sekvenser og hele T-DNAet som prober. P35S-proben, 540 bp, ble syntetisert v.h.a. PCR (figur 3).



Figur 3. Skjematisert tegning av plasmidprober benyttet for påvisning av pUC/AC sekvenser i T25.

CropScience hevder at de påviste DNA-fragmentene på Southern-blottene er i henhold til sekvensene på insertet. Genomisk T25 DNA ble kuttet med fire forskjellige restriksjonsenzymmer, *NcoI*, *EcoRV*, *EcoRI* og *DraI*.

I en publisert karakterisering av insertet i T25 (Collonnier *et al.* 2005), beskrives rearrangement og duplisering av deler av insertet. Collonnier *et al.* viser at integreringsstedet i T25 er i et område som har høy homologi med Huck retrotransposon familien, som muliggjør ustabil integrering. Erfaring tilsier at insertet er stabilt integrert.

AmpR-genet er ikke funksjonelt fordi 25 % av genet er deletert. Bayer CropScience har lagt ved dokumentasjon fra 1999, som viser at det ikke kan påvises mRNA fra det trunkerte *ampR*-genet med Northern-blot. Analysene som er gjort med mRNA fra blad av hybrid LH82 x T25 tyder på at det trunkerte *ampR*-genet ikke uttrykkes. Bayer har også utført analyser med ¹⁴C-penicillin på bladekstrakt fra T25 for å påvise β-laktamaseaktivitet. Det ble ikke påvist β-laktamaseaktivitet.

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

I dokumentasjonen fra 2007/2008 viser søker til at nivået av uttrykk av PAT-protein ble målt i et veksthusforsøk i Belgia i 2006. Forsøket bestod av T25 og en nær-isogen kontrollinje, totalt 160 planter. De transgene plantene ble behandlet med glufosinat-ammonium rett før prøvetaking. Det ble tatt prøver av blad, stilk og røtter på to ulike vekststadier (V5-V6, R6). Prøver fra 10 planter fra hver gruppe ble analysert vha ELISA.

Det ble detektert PAT-protein i alle undersøkte vev og utviklingsstadier. Dette er som forventet siden genet er under kontroll av den konstitutive promotoren 35S. Nivået av PAT-protein i blad og stilk økte over tid, mens nivået i rotprøvene var tilnærmet konstant. Uttrykket av proteinet var høyest i grønt vev i begge vekststadier. Det ble vist en reduksjon av uttrykk av PAT-protein som andel av totalt løselig protein over tid i prøvene fra blad og stilk. Ifølge søker varierte konsentrasjonen i bladvev fra 3,06-1,58 %, stilk 0,58 -0,28 % og rotvev 0,67 – 0,54 %.

I et veksthusforsøk fra 1999 ble fosfinotricin acetyltransferase-aktiviteten undersøkt i prøver av pollen, blad, røtter og stilk ved måling av acetylering av L-¹⁴C-Glufosinate til ¹⁴C-N-acetyl-glufosinat (HPLC). Prøvene ble tatt av T25-planter under blomstring. I tillegg ble PAT-aktiviteten i frø undersøkt. Den høyeste enzym-aktiviteten ble funnet i stilk og blad, henholdsvis 50,9 mU/mg protein og 41,3 mU/mg protein. Tilsvarende ble det målt 5,3 og 0,682 mU/mg protein i røtter og frø. Det ble ikke påvist PAT-aktivitet i pollen

I 2003 ble det foretatt analyser av sekvensene i 5'- og 3'-enden av insertet. Det ble sekvensert henholdsvis 308 bp og 150 bp. For disse flankerende sekvensene ble det påvist høy grad av sekvenslikhet (90-97 %) til flere maisgener samt til *Huck-2* retrotransposonsekvenser. Bayer har også lagt ved dokumentasjon på åpne leserammer (ORF). Det ble påvist 6 ORF i området rundt forbindelsen mellom insertet og genomisk mais-DNA. Bayer har ikke påvist at disse ORFene har regulatoriske sekvenser som er nødvendige for transkripsjon og translasjon. Bayer hevder at sannsynligheten for ekspresjon fra insertet av andre proteiner enn PAT er usannsynlig. Uten vedlagt dokumentasjon kan vi ikke si noe sikkert her angående *pat*, utover at genet uttrykkes og gir et forholdsvis lavt proteinprodukt. 35S promotoren er ikke så sterkt regulert i enfrøbladete planter som i tofrøbladete, som kan være noe av årsaken til at en observerer et noe beskjedent PAT- produkt i T25. Dette er likevel tilstrekkelig til å gi glufosinattoleranse. Videre dokumenterer søker at *ampR*- genet ikke kan detekteres på Northern blot, som regnes som sannsynlig pga delesjonen av gensekvensen.

Nedarving og stabilitet av genkonstruksjonen og innsatt DNA

Søker viser til resultater av Southern analyse og spaltingsdata innen og over generasjoner for å vise genetisk og fenotypisk stabilitet. I tillegg henvises det til resultater fra analyser av proteinuttrykk over flere generasjoner og kontinuerlig overvåking av fenotypisk stabilitet over en rekke generasjoner i forbindelse med kommersiell dyrking av maislinjen. *Pat*-genet i T25 nedarves som ett lokus, og uttrykkes stabilt, uavhengig av genotype, generasjon og miljø.

Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag

Maislinjen T25 har fått tilført en modifisert utgave av *pat* genet fra *Streptomyces viridochromogenes* stamme Tü 494, og et delvis deletert β -lactamase fra pUC vektoren ved genoverføring til protoplaster. Etter ny informasjon fra søker om integreringsplass, flankesekvenser mellom integrert transgen og genomet og Southern, er det på bakgrunn av nedarvingsresultatene er grunn til å tro at transgenene sitter i et locus i genomet. Bayer hevder at sannsynligheten for ekspresjon fra insertet av andre proteiner enn PAT er usannsynlig. Uten vedlagt dokumentasjon kan vi ikke si noe sikkert her angående *pat*, utover at genet uttrykkes og gir et forholdsvis lavt proteinprodukt. Det trunkerte β -lactamase-genet uttrykkes ikke i T25, mens *pat*-genet er funksjonelt. *Pat*-genet i T25 nedarves som ett locus, og uttrykkes stabilt, uavhengig av genotype, generasjon og miljø.

2.3 Hybrid NK603 x T25

Molekylær karakterisering

Molekylærbiologiske analyser viser at de rekombinante fragmentene i planten inneholder de samme gener og genelementer som er i foreldrelinjene NK603 og T25. CP4 EPSPS- og PAT-ekspresjonskassetten er undersøkt med Southern-blot analyser. Disse analysene viser at integriteten til ekspresjonskassetten ikke er blitt endret ved krysning mellom NK603 og T25. Flankerende sekvenser til de rekombinante DNA-fragmentene i NK603 x T25 er ikke sekvensert. Siden NK603 x T25 er fremkommet ved konvensjonell kryssing mellom NK603 og T25 hevder søker at sekvensene i og rundt de respektive fragmentene er uendret. Monsanto har lagt ved dokumentasjon over analyser av åpne leserammer for både NK603 og T25. Analysene er utført henholdsvis i 2002 og 2007. Det er ikke vist at innsettingen av de rekombinante fragmentene har medført nye åpne leserammer.

Analyser av enzymatisk aktivitet av CP4 EPSPS-proteinet, dokumentert i NK603-søknad, viser ingen forskjell mellom plante- og bakterieprodusert protein. Fordøyelighetstesten viste også at CP4 EPSPS-proteinet fordøyes raskt i simulert mage- og tarmsaft. Fordøyelighetstester dokumentert i søknadene for T25 viser at PAT-proteinet også fordøyes raskt i simulert magesaft.

Informasjon vedr. uttrykk av introduserte gener

I vedlagte søknad presenterer Monsanto resultater fra en proteinekspresjonsstudie i USA vekstsesongen 2008. Forsøkene ble lagt ut på fem lokaliteter i representative områder for maisdyrking i USA. Forsøkene inkluderte foruten testlinjen, umodifisert kontrollhybrid LH283 x PSB3274, samt foreldrelinjene NK603 og T25. For nærmere beskrivelse av testmateriale, forsøksdesign og – metodikk, se kapittel 3. Det ble tatt prøver av blad, rotvev, hel plante, fôr, korn og pollen på ulike tidspunkt gjennom vekstsesongen.

Ekspressjonen av CP4 EPSPS- og PAT-proteinene ble målt ved hjelp av enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) i ulike plantevev og på ulike vekststadier. Det ble tatt prøver for analyse av blad, rotvev og hel plante ved henholdsvis vekststadium V2-V4 og V10-V12. Prøver av pollen ble tatt ved pollenspredning (R1) og korn ved fysiologisk modning (R6). I tillegg ble det tatt prøver av fôrfraksjon og røtter ved høsting som fôrmais (tidlig "dent-fase" (R5). For nærmere beskrivelse av vegetative og reproduktive utviklingsstadier hos mais, se forkortelser og ordforklaringer.

Nivåene av CP4 EPSPS- og PAT-protein i ulike plantevev og utviklingsstadier er vist i tabell 4. I gjennomsnitt over forsøkssteder ble nivåene av CP4 EPSPS målt til 190, 40 og 160 $\mu\text{g/g}$ tørrvekt (t.v.) i henholdsvis blad, rotvev og hel plante på vekststadium V2-V4 og V10-V12. Gjennom vekstsesongen varierte de gjennomsnittlige konsentrasjonene av proteinet mellom 110 – 260 $\mu\text{g/g}$ t.v. i blad, 30-110 $\mu\text{g/g}$ t.v. i røtter og 120-270 $\mu\text{g/g}$ t.v. i hel plante. I røtter (R5), fôrfraksjon, pollen og korn ble det gjennomsnittlige nivået av CP4 EPSPS målt til henholdsvis 25, 53, 200 og 8,1 $\mu\text{g/g}$ t.v.

Tilsvarende ble nivået av PAT-protein i blad og røtter på vekststadium V2-V4 målt til henholdsvis 48 og 23 µg/g t.v. Tilsvarende målinger av prøver fra hel plante viste 63 µg/g t.v. Gjennom vekstsesongen varierte konsentrasjonen av proteinet mellom 26 – 69 µg/g t.v. i blad, 9,3-63 µg/g t.v. i røtter og 48-80 µg/g t.v. i hel plante. I fôrfraksjon, røtter (R5) og korn ble det gjennomsnittlige nivået av PAT målt til henholdsvis 21, 14 og 0,59 µg/g t.v. Analyser av pollen viste at nivået av PAT-protein var under deteksjonsgrensen på 0,085 µg/g råvekt.

Dokumentasjonen fra søker viser at nivåene av målte proteinprodukter i vegetativt vev og frø er i overensstemmelse med variasjonsområdene for de respektive foreldrelinjene.

Tabell 4. Gjennomsnittlige konsentrasjoner av CP4 EPSPS- og PAT-protein i ulike plantevev fra NK603 x T25 og de respektive foreldrelinjene NK603 og T25. Resultater fra feltforsøk i USA vekstsesongen 2008.

| Vevstype | Utv. trinn ¹ | CP4 EPSPS | | PAT | |
|-------------|-------------------------|---|---|---|---|
| | | NK603 x T25 | NK603 | NK603 x T25 | T25 |
| | | Gj.snitt (SD) Variasjons- område (µg/g t.v.) | Gj.snitt (SD) Variasjons- område (µg/g t.v.) | Gj.snitt (SD) Variasjons- område (µg/g t.v.) | Gj.snitt (SD) Variasjons- område (µg/g t.v.) |
| Blad | V2-V4 | 190 (41) 110-260 | 180 (33) 130-230 | 48 (13) 26-69 | 52 (23) 14-90 |
| Røtter | V2-V4 | 48 (23) 30-110 | 53 (22) 34-100 | 23 (14) 9,3-63 | 29 (21) 9,6-86 |
| Hel plante | V10- V12 | 160 (43) 120-270 | 180 (79) 110-450 | 63 (9,1) 48-80 | 78 (12) 65-110 |
| Røtter -fôr | R5 | 25 (4,4) 16-30 | 24 (3,9) 17-31 | 21 (4,5) 12-29 | 28 (10) 9,3-48 |
| Fôrfraksjon | R5 | 53 (17) 25-96 | 50 (15) 29-85 | 14 (5,6) 6,7-25 | 14 (9,2) 6,1-39 |
| Korn | R6 | 8,1 (1,1) 6,2-10 | 7,2 (1,4) 5,5-11 | 0,59 (0,18) 0,28-0,83 | 0,43 (0,10) 0,29-0,68 |
| Pollen | R1 | 200 (32) 160-260 | 180 (24) 160-250 | N/A N/A | N/A N/A |

1 Utviklingstrinnene er beskrevet i oversikten over ordforklaringer/forkortelser

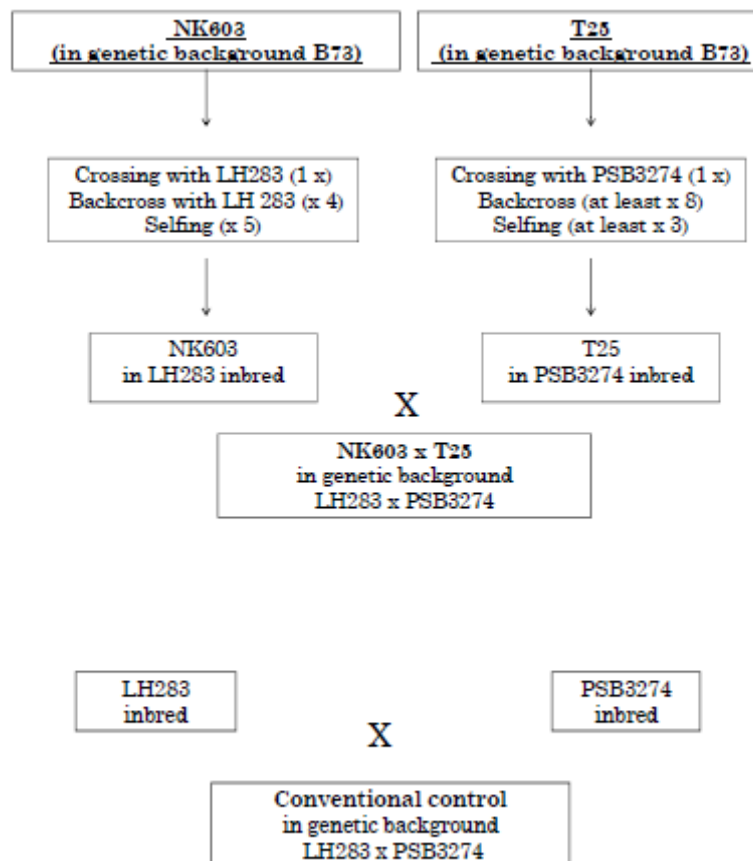
2 Pollen LOD= 0,085 µg/g råvekt

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

Molekylærbiologiske analyser av F₁-hybriden viser at det er molekylær ekvivalens og identisk kopitall mellom de rekombinante DNA-innskuddene i de respektive foreldrelinjene. På bakgrunn av disse studiene, samt analyser av proteinekspresjon og agronomiske karakterer konkluderer søker med at de rekombinante innskuddene i hybridene er stabilt integrert i genomet. Videre vises det til at F₂-generasjonen som høstes, kun skal benyttes til mat og fôr, og ikke inngå i videre foredlingsarbeid. Søker vurderer derfor det derfor ikke nødvendig å undersøke stabilitet over generasjoner.

Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag

F₁-hybriden NK603 x T25 er dannet ved konvensjonelle kryssinger mellom de innavlede maislinjene NK603 og T25. Spaltingsdata og Southern-analyser indikerer at de innsatte strukturene nedarves stabilt, og at antall, struktur og organisering av disse genkonstruksjonene er ekvivalent med de som finnes i foreldrelinjene. Nivåene av CP4 EPSPS- og PAT-proteiner i vegetativt vev og frø er sammenlignbare med uttrykk av tilsvarende proteinprodukter i foreldrelinjene.



Figur 4. Kryssingsskjema for hybridene NK603 x T25 og isogen kontroll (Monsanto 2009).

3 Komparative analyser

3.1 Valg av komparator og forsøksdesign

I henhold til søkers dokumentasjon er hybrid NK603 x T25 testet i feltforsøk over en vekstsesong i sentrale dyrkingsområder for mais i USA. Feltforsøkene for komparative analyser av ernæringsmessige karakterer ble utført på fem lokaliteter i 2008. Den konvensjonelle maishybriden LH283 x PSB3274, med tilsvarende genetisk bakgrunn som testlinjen, men som ikke uttrykker CP4 EPSPS- og PAT-protein, ble benyttet som umodifisert kontroll i forsøkene. I tillegg var det inkludert 19 umodifiserte, kommersielle maislinjer som referansesorter i forsøkene (3-4 sorter på hvert forsøkssted). Forsøksruter med testlinjen NK603 x T25 ble sprøytet både med glyfosat (Monsantos Roundup WeatherMax - ca. 0,8 kg glyfosat/hektar) og glufosinat-ammonium (Bayers Liberty -0,44 kg glufosinat/hektar). Sprøyteregimet inkluderte også insekticider, samt andre herbicider. Søker viser til at dyrkingsregimet for øvrig var i henhold til vanlig praksis i den enkelte region der forsøkene var lokaliserte

Testlinje, komparator og referansesorter ble plantet i fullstendig randomiserte blokkdesign med tre gjentak på hver lokalitet. Det ble tatt ut prøver fra tre gjentak per lokalitet for analyser av ernæringsmessig viktige komponenter både hos testlinje, kontrollinjen og referansesortene.

Statistiske analyser

I Nordisk ministerråds rapport "Safety Assessment of Novel Food Plants: Chemical Analytical Approaches to the Determination of Substantial Equivalence" (TemaNord 1998), anbefales det at tilstrekkelig antall prøver må analyseres for å få adekvat sensitivitet for statistisk analyse. Spredning i enkeltparametre skal være sammenlignbare for genetisk modifisert plante og umodifisert plante. I rapporten er det anbefalt at spredningen i enkeltverdier bør ligge innenfor $\pm 20\%$. Faggruppe for genmodifiserte organismer benytter denne anbefalingen som grunnlag for vurdering av forsøksresultatene.

3.2 Analyser av ernæringsmessige komponenter

Hovedkomponenter i maisfrø og fôr

Flertallet av de valgte analyseparametere er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002). I maisfrø ble følgende parametere analysert; protein, fett, aske, vann, karbohydrater, ADF, NDF, aminosyrer, fettsyrer (linol-, olje-, palmitin-, stearin- og linolensyre), fosfor, jern, kalium, kalsium, kobber, magnesium, mangan, natrium, selen, sink, vitaminene B1, B2, B3, B6, E, folinsyre og β -karoten, de sekundære metabolittene furfural, ferulsyre og p-kumarinsyre, og anti-næringsstoffene fytinsyre, inositol, trypsinhemmer og raffinose. Analysene ble utført under god laboratoriepraksis (GLP).

Fôrfraksjonen

Fôrfraksjonen er analysert for innhold av aske, fett, protein, vann, ADF (acid detergent fibre), NDF (neutral detergent fibre), fosfor, kalsium og karbohydrater (tabell 5). Kombinerte analyser over lokaliteter viser statistisk signifikante forskjeller mellom testhybrid og kontroll for vann og protein ($p \leq 0,05$). Resultatene viser imidlertid at forskjellene er små. Verdiene for de analyserte komponentene ligger også innenfor toleranseintervallene for referansesortene som inngikk i studien og innenfor typiske verdier som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2007) og OECDs konsensusdokument for mais (2002).

Tabell 5. Resultater fra analyser av fôrfraksjon fra testlinjen NK603 x T25 og umodifisert kontroll LH283 x PSB3274. Fra feltforsøk i USA 2008.

| Komponenter analysert (g/100 g tørrvekt) | Gjennomsnitt [Variasjonsområde] | | p-verdi ¹ | Variasjonsområde kommersielle referansesorter |
|--|---------------------------------|-------------------------------|----------------------|---|
| | NK603 x T25 | LH283 x PSB3274 | | |
| Vann (% råvekt) | 70,21 (0,53) (66,70-73,6) | 72,97 (70,10-75,50) | 0,004 | 67,4-76,30 |
| Aske | 4,20 (0,25) (3,01-6,40) | 4,23 (0,25) (3,07-5,80) | 0,916 | 3,32-5,74 |
| Fett | 1,90 (0,14) (1,32-2,63) | 2,05 (0,14) (1,17-2,63) | 0,343 | 0,74-2,44 |
| Protein | 7,37 (0,29) (5,91-8,23) | 7,85 (0,29) (6,50-9,02) | 0,035 | 4,77-8,45 |
| Karbohydrater | 86,56 (0,33) (85,62-88,38) | 85,87 (0,33) (83,72-88,85) | 0,092 | 85,07-89,37 |
| ADF | 27,38 (0,83) (21,97-32,50) | 29,02 (0,83) (22,85-39,23) | 0,166 | 21,11-42,64 |
| NDF | 40,92 (1,16) (32,93-52,51) | 40,18 (1,16) (34,63-46,35) | 0,642 | 31,34-57,76 |
| Kalsium | 0,20 (0,010) (0,14-0,25) | 0,19 (0,010) (0,14-0,25) | 0,467 | 0,12-0,25 |
| Fosfor | 0,20 (0,017) (0,15-0,25) | 0,21(0,017) (0,13-0,28) | 0,330 | 0,13-0,27 |

¹p<0,05*Hovedkomponenter i maisfrø*

I henhold til søkers dokumentasjon er følgende komponenter analysert: aske, fett, protein, vann, karbohydrater, ADF, NDF, TDF og stivelse (se tabell 6). Med unntak for stivelse, aske og NDF (g x e-samspill) viser kombinerte analyser over lokaliteter ingen signifikante forskjeller mellom den transgene hybriden og kontroll for de analyserte komponentene. Verdiene for disse komponentene ligger innenfor toleranseintervallene for referansesortene som inngikk i studien og innenfor typiske verdier som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2007) og OECDs konsensusdokument for mais (2002).

Tabell 6. Resultater fra analyser av hovedkomponenter i maisfrø fra testlinjen NK603 x T25 og umodifisert kontroll LH283 x PSB3274. Fra feltforsøk i USA 2008.

| Komponenter analysert (g/100 g tørrvekt) | Gjennomsnitt (S.E.) [Variasjonsområde] | | p-verdi ¹ | Variasjonsområde kommersielle referansesorter |
|--|--|-------------------------------|----------------------|---|
| | NK603 x T25 | LH283 x PSB3274 | | |
| Vann (% råvekt) | 9,56 (0,41) (7,87-11,20) | 9,75 (0,41) (8,59-11,00) | 0,640 | 8,18-10,40 |
| Aske | 1,60 (0,053) (1,34-1,88) | 1,53 (0,053) (1,25-1,75) | 0,015 | 1,14-1,70 |
| Totalt fett | 3,67 (0,040) (3,42-3,93) | 3,65 (0,040) (3,47-3,84) | 0,696 | 3,11-4,62 |
| Protein | 11,65 (0,32) (10,06-13,12) | 11,93 (0,32) (11,05-12,84) | 0,265 | 8,87-11,69 |
| Karbohydrater | 83,08 (0,32) (81,70-84,55) | 82,90 (0,32) (81,97-84,02) | 0,418 | 83,05-86,32 |
| ADF | 3,61(0,13) (2,72-4,19) | 29,02 (0,83) (22,85-39,23) | 0,450 | 2,47-3,83 |
| NDF | 10,48 (0,39) (8,50-13,30) | 9,88 (0,39) (8,71-11,35) | 0,117 | 6,76-10,27 |
| TDF | 14,24 (0,37) (11,72-15,75) | 14,04 (0,37) (12,61-15,59) | 0,590 | 10,11-14,90 |

¹p<0,05

Fettsyresammensetning i mais

Fettsyresammensetningen for maisfrø er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Det ble analysert for innhold av 22 ulike fettsyrer. I henhold til søker er innholdet av 13 av fettsyrene ved eller lavere enn de respektive påvisningsgrensene. Resultatene av variansanalysen mellom transgen mais og kontroll for ni av fettsyrene, viser signifikante forskjeller for palmitin-, palmitol-linol-, linolen- og oljesyre (tabell 7). Forskjellene som er målt er imidlertid mindre enn 20 %, og verdiene ligger innenfor toleranseintervallene for referansesortene som inngikk i studien (tabell 7) og innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2007) og OECDs konsensusdokument for mais (2002).

Tabell 7. Resultater fra analyser av fettsyrer i maisfrø fra testlinjen NK603 x T25 og umodifisert kontroll LH283 x PSB3274. Fra feltforsøk i USA 2008.

| Komponenter analysert (% av totale fettsyrer) | Gj.snitt (S.E.) [Variasjonsområde] | | p-verdi ¹ | Variasjonsområde kommersielle referansesorter |
|---|------------------------------------|---------------------------------|----------------------|---|
| | NK603 x T25 | LH283 x PSB3274 | | |
| 16:0 Palmitinsyre | 9,48 (0,03) [9,27 – 9,63] | 9,34 (0,03) [10,80 - 12,04] | 0,002 | 9,13-13,42 |
| 16:1 Palmitolsyre | 0,17 (0,0034) [0,16 - 0,18] | 0,16 (0,0034) [0,063 - 0,10] | 0,022 | 0,059-0,15 |
| 18:0 Stearinsyre | 1,76 (0,045) [1,66 – 1,97] | 1,77 (0,045) [1,68 – 1,96] | 0,752 | 1,45-2,44 |
| 18:1 Oljesyre | 27,82 (0,62) [26,20 - 29,86] | 28,24 (0,62) [26,52 - 29,97] | 0,026 | 22,40-32,75 |
| 18:2 Linolsyre | 59,05 (0,64) [56,88 – 60,74] | 58,70 (0,62) [56,41 – 60,42] | 0,068 | 51,35-64,07 |
| 18:3 Linolensyre | 0,94 (0,0092) [0,90 - 1,00] | 1,02 (0,0092) [0,97 - 1,07] | <0,001 | 0,85-1,30 |
| 20:0 Arkidinsyre | 0,41 (0,0095) [0,38 - 0,45] | 0,40 (0,0095) [0,38 - 0,44] | 0,258 | 0,31-0,48 |
| 20:1 Gadolinsyre | 0,22 (0,0015) [0,21 - 0,22] | 0,22 (0,0015) [0,21 - 0,22] | 0,160 | 0,19-0,28 |
| 22:0 Behensyre | 0,15 (0,0066) [0,072 - 0,16] | 0,14 (0,0066) [0,068 - 0,16] | 0,577 | 0,054-0,16 |

¹p<0,05

Aminosyrer i maisfrø

I henhold til dokumentasjonen er innholdet av både essensielle og ikke-essensielle aminosyrer analysert (tabell 8). Analysene er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2009). Statistiske analyser over steder i USA viser ingen signifikante forskjeller mellom testhybrid og kontroll (tabell 8). Verdiene ligger innenfor toleranseintervallene for referansesortene som inngikk i studien og innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2007) og OECDs konsensusdokument for mais (2002).

Tabell 8. Resultater fra analyser av aminosyrer i maisfrø fra testlinjen NK603 x T25 og umodifisert kontroll LH283 x PSB3274. Fra feltforsøk i USA 2008.

| Komponenter analysert (% tørrvekt) | Gjennomsnitt (S.E.) [Variasjonsområde] | | p-verdi ¹ | Variasjonsområde kommersielle referansesorter |
|------------------------------------|---|-----------------------------------|----------------------|---|
| | NK603 x T25 | LH283 x PSB3274 | | |
| Alanin | 0,93 (0,033) [0,84 - 1,09] | 0,94 (0,033) [0,86 - 1,03] | 0,710 | 0,66 - 0,97 |
| Arginin | 0,49 (0,0097) [0,44 - 0,55] | 0,50 (0,0097) [0,46 - 0,55] | 0,596 | 0,36 - 0,56 |
| Asperginsyre | 0,75 (0,016) [0,67 - 0,84] | 0,75 (0,016) [0,70 - 0,80] | 0,962 | 0,57 - 0,78 |
| Cystin | 0,24 (0,0057) [0,22 - 0,26] | 0,24 (0,0057) [0,22 - 0,25] | 0,774 | 0,20 - 0,26 |
| Glutaminsyre | 2,32 (0,080) [2,09 - 2,69] | 2,34 (0,080) [2,15 - 2,56] | 0,720 | 1,65 - 2,43 |
| Glycin | 0,40 (0,0066) [0,36 - 0,43] | 0,40 (0,0066) [0,38 - 0,41] | 0,696 | 0,34 - 0,42 |
| Histidin | 0,30 (0,0073) [0,27 - 0,34] | 0,31 (0,0073) [0,29 - 0,32] | 0,996 | 0,25 - 0,33 |
| Isoleucin | 0,43 (0,013) [0,38 - 0,48] | 0,44 (0,013) [0,39 - 0,48] | 0,723 | 0,30 - 0,47 |
| Leucin | 1,58 (0,061) [1,43 - 1,86] | 1,60(0,061) [1,44 - 1,77] | 0,597 | 1,07 - 1,70 |
| Lysin | 0,30 (0,0031) [0,26 - 0,31] | 0,30 (0,0031) [0,29 - 0,30] | 0,846 | 0,26 - 0,34 |
| Metionin | 0,23 (0,0086) [0,21 - 0,26] | 0,23 (0,0086) [0,21 - 0,25] | 0,359 | 0,17 - 0,25 |
| Fenylalanin | 0,62 (0,021) [0,56 - 0,70] | 0,63(0,021) [0,57 - 0,69] | 0,767 | 0,44 - 0,67 |
| Prolin | 1,05 (0,036) [0,93 - 1,21] | 1,05 (0,036) [0,96 - 1,16] | 0,930 | 0,77 - 1,07 |
| Serin | 0,56(0,018) [0,50 - 0,66] | 0,56 (0,018) [0,49 - 0,61] | 0,829 | 0,40 - 0,55 |
| Treonin | 0,39 (0,010) [0,37 - 0,44] | 0,40 (0,010) [0,37 - 0,42] | 0,748 | 0,30 - 0,39 |
| Tryptofan | 0,051 (0,0016) [0,030 - 0,062] | 0,049 (0,0016) [0,040 - 0,060] | 0,280 | 0,030 - 0,059 |
| Tyrosin | 0,32 (0,020) [0,20 - 0,42] | 0,34 (0,020) [0,21 - 0,43] | 0,375 | 0,14 - 0,40 |
| Valin | 0,55 (0,015) [0,48 - 0,61] | 0,55 (0,015) [0,50 - 0,60] | 0,096 | 0,42 - 0,57 |

Vitaminer

I henhold til OECDs konsensusdokument for mais bør følgende vitaminer analyseres: A, B1, B2, B6, C, E, folat og niacin. I følge dokumentasjonen fra søker er ikke innholdet av vitamin C målt. Vitamin A er målt som β -karoten. Det er funnet signifikante forskjeller mellom test- og kontrollinje med hensyn på innhold av vitamin A og B1 (tabell 9). Verdiene ligger imidlertid innenfor toleranseintervallene for referansesortene som inngikk i studien (tabell 9) og typiske verdier som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2007) og OECDs konsensusdokument for mais (2002). Det ble også påvist signifikante genotype x sted-samspill for vitamin A.

Tabell 9. Resultater fra analyser av vitaminer i prøver fra maisfrø fra testlinjen NK603 x T25 og umodifisert kontroll LH283 x PSB3274. Fra feltforsøk i USA 2008.

| Komponenter analysert (mg/kg tørrvekt) | Gjennomsnitt (S.E.) [Variasjonsområde] | | p-verdi ¹ | Variasjonsområde kommersielle referansesorter |
|--|--|---------------------------------|----------------------|---|
| | NK603 x T25 | LH283 x PSB3274 | | |
| Vitamin A | 1,03 (0,039) [0,90 – 1,14] | 1,08 (0,039) [0,88 – 1,21] | 0,001 | 0,72 – 1,73 |
| Vitamin B1 | 3,28 (0,052) [3,08 – 3,78] | 2,97 (0,052) [2,54 – 3,23] | <0,001 | 2,76 – 4,56 |
| Vitamin B2 | 1,77 (0,13) [1,16 – 2,55] | 1,70 (0,13) [1,14 – 2,47] | 0,581 | 1,12 – 2,54 |
| Vitamin B6 | 6,56 (0,23) [5,40 – 7,66] | 6,29 (0,23) [5,28 – 7,36] | 0,431 | 5,18 – 8,56 |
| Vitamin E | 10,20 (0,42) [8,83-15,41] | 10,08 (0,42) [8,82 – 10,97] | 0,687 | 6,83 – 19,93 |
| Folinsyre | 0,32 (0,022) [0,24 – 0,43] | 0,31 (0,022) [0,24 – 0,51] | 0,651 | 0,25 – 0,48 |
| Niacin | 23,35 (1,05) [16,85 – 31,76] | 22,30 (1,05) [18,59 – 25,30] | 0,350 | 15,27 – 27,73 |

¹p<0,05

Mineraler

Innholdet av mineraler er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Innholdet av natrium og selen var lavere enn påvisningsgrensen både i umodifisert og modifisert mais. For kalium ble det funnet signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll ($p \leq 0,05$) (tabell 10). De statistiske forskjellene som er påvist er imidlertid lavere enn 20 %, og samtlige verdier ligger innenfor toleranseintervallene for referansesortene som inngikk i studien og typiske verdier som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2007).

Tabell 10. Resultater fra analyser av mineraler i prøver fra maisfrø fra testlinjen NK603 x T25 og umodifisert kontroll LH283 x PSB3274. Fra feltforsøk i USA 2008.

| Komponenter analysert | Gjennomsnitt (S.E.) [Variasjonsområde] | | p-verdi ¹ | Variasjonsområde kommersielle referansesorter |
|-------------------------------|---|---------------------------------------|----------------------|---|
| | NK603 x T25 | LH283 x PSB3274 | | |
| Fosfat (% tørrvekt (t.v.)) | 0,34 (0,013) [0,29 – 0,38] | 0,34 (0,013) [0,28 – 0,37] | 0,619 | 0,25 – 0,36 |
| Jern (mg/kg t.v.) | 24,64 (0,62) [21,32 – 29,11] | 23,73 (0,62) [22,25 – 26,82] | 0,076 | 15,94 – 29,41 |
| Kalium (% t.v.) | 0,36 (0,0075) [0,33 – 0,39] | 0,35 (0,0075) [0,32 – 0,38] | 0,025 | 0,31 – 0,41 |
| Kalsium (% t.v.) | 0,0040 (0,00010) [0,0037 – 0,0045] | 0,0041 (0,00010) [0,0035 – 0,0050] | 0,498 | 0,0029 – 0,0049 |
| Kobber (mg/kg t.v.) | 1,88 (0,096) [1,68 – 2,13] | 1,91 (0,096) [1,57 – 3,43] | 0,777 | 1,21 – 2,58 |
| Magnesium (% t.v.) | 0,13 (0,0028) [0,12 – 0,14] | 0,13 (0,0028) [0,12 – 0,14] | 0,794 | 0,10 – 0,14 |
| Mangan (mg/kg t.v.) | 9,08 (0,97) [7,30-13,68] | 9,06 (0,972) [6,88 – 12,84] | 0,945 | 4,48 – 12,99 |
| Sink (% t.v.) | 29,15 (1,67) [22,14 – 35,99] | 28,63 (1,67) [23,47 – 37,18] | 0,387 | 19,04 – 27,63 |

¹p<0,05*Sekundære metabolitter, antinæringsstoffer og oligosakkarider*

Sekundære metabolitter og antiernæringskomponenter er ikke målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Søker har analysert for ferulsyre, p-kumarsyre, fytinsyre og raffinose, men ikke furfural som anbefales av OECD. Det ble funnet statistisk signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll for raffinose ($p \leq 0,05$) (tabell 11). Verdiene imidlertid ligger innenfor toleranseintervallene for referansesortene som inngikk i studien og typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2007).

Tabell 11. Resultater fra analyser av oligosakkarider og antinæringsstoffer i maisfrø fra testlinjen NK603 x T25 og umodifisert kontroll LH283 x PSB3274. Fra feltforsøk i USA 2008.

| Komponenter analysert | Gjennomsnitt (S.E.) [Variasjonsområde] | | p-verdi ¹ | Variasjonsområde kommersielle referansesorter |
|--------------------------|---|--|----------------------|---|
| | NK603 x T25 | LH283 x PSB3274 | | |
| Ferulsyre (µg/g tv) | 2166,23 (66,00) [1828,53 – 2689,73] | 2038,80 (66,00) [1426,52 – 2269,19] | 0,061 | 1462,05 – 2371,94 |
| p-kumarsyre (µg/g tv) | 215,03 (10,06) [171,12 – 314,73] | 229,83 (10,06) [193,98 – 266,52] | 0,082 | 100,79 – 266,15 |
| Fytinsyre (% t.v.) | 0,97 (0,048) [0,59 - 1,11] | 1,01 (0,048) [0,79 - 1,13] | 0,106 | 0,68 – 1,07 |
| Raffinose (% t.v.) | 0,18 (0,015) [0,98 - 1,29] | 0,20 (0,015) [0,95 - 1,35] | 0,039 | 0,089 – 0,17 |

¹p<0,05

3.3 Agronomiske karakterer

I følge dokumentasjonen fra søker er den transgene maishybriden NK603 x T25 testet i feltforsøk over en vekstsesong i sentrale dyrkingsområder for mais i USA. I tillegg vises det til feltforsøk med foreldrelinjene NK603 og T25 som er presentert i tidligere søknader (EFSA/GMO/NL/2005/22; EFSA/GMO/ NL/2007/46).

Feltforsøkene ble utført på fem lokaliteter i statene Illinois, Iowa og Kansas vekstsesongen 2008. Den konvensjonelle maishybriden LH283 x PSB3274, med tilsvarende genetisk bakgrunn som testlinjen, men som ikke uttrykker CP4 EPSPS- og PAT-protein, ble benyttet som umodifisert kontroll i forsøkene. I tillegg var det inkludert til sammen 20 umodifiserte, kommersielle hybridsorter som referansemateriale i forsøkene (fire sorter på hvert forsøkssted). Referansesortene har ulik tidlighet og er tilpasset dyrkingsforholdene i de ulike regionene der forsøkene var lokaliserte. Kryssingsskjema for NK603 x T25 og LH283 x PSB3274 er vist i figur 4.

I henhold til dokumentasjonen ble testlinje, komparator og referansesorter plantet i fullstendig randomiserte blokkdesign med tre gjentak på hver lokalitet. Hver forsøksrute bestod av 6 planterekker, der registreringene av fenotypiske og agronomiske data ble foretatt på rekke nr fire og fem.

Søker viser til at dyrkingsregimet var i henhold til vanlig praksis i den enkelte region der forsøkene var lokaliserte. Forsøksrutene ble ikke sprøytet med herbicider med virkestoff glyfosat og glufosat-ammonium. Informasjon om sprøyteregimet for øvrig er ikke vedlagt. I henhold til EFSA's retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter (EFSA 2006a) skal feltforsøk med herbicidtolerante planter inkludere både ubehandlede blokker og blokker sprøytet med tiltenkte herbicider.

Det ble foretatt registreringer av totalt 14 ulike fenotypiske og agronomiske karakterer, inkludert parametre som vitalitet hos frøplanten, plantetetthet (vår & høst), tap av kolber, plantehøyde, legde, tidlighet og frøavling (tabell 12). I tillegg oppgir søker at det er gjort observasjoner av resistens mot

ulike biotiske (sjukdoms- og insektsresistens) og abiotiske stressfaktorer (lave temperaturer, tørke, nedbør, varme, vind, jordpakking, vannmetting jord, næringsmangel) på ulike vekststadier.

I henhold til dokumentasjonen har søker kjørt statistiske analyser innen lokaliteter og kombinerte analyser over lokaliteter for hver enkelt karakter (standard F-test). Det er ikke foretatt statistiske sammenligninger mellom testlinje og referansesorter, men det er beregnet gjennomsnittlige maksimums- og minimumsverdier for de kommersielle linjene. Resultatene fra variansanalysene er klassifisert som konfidensiell informasjon og kan derfor ikke presenteres i detalj her.

Variansanalysene over forsøkssteder viste ingen signifikante forskjeller mellom testlinje NK603 x T25 og umodifisert kontroll for noen av de observerte fenotypiske og agronomiske karakterene (tabell 12). Analyser innen steder viste totalt seks signifikante forskjeller mellom testlinje og komparator for fem av variablene ($p \leq 0,05$).

Når det gjelder respons på abiotisk stress, ble det detektert signifikante forskjeller mellom NK603 og konvensjonell kontroll for hagl på ett av forsøksstedene, men verdiene var innen variasjonsområdet for referansesortene som var inkludert i forsøkene (data ikke vist). Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom den transgene maishybriden og kontroll med hensyn på resistens mot sykdommer og skadedyr (artropoder).

Tabell 12. Resultater fra variansanalyse over steder for fenotypiske og agronomiske karakterer for den transgene testlinjen NK603 x T25 og umodifisert kontrollhybrid LH283 x PSB3274. Fra feltforsøk i USA vekstsesongen 2008.

| Karakterer (måleenhet) | Utvikl. trinn ¹ | Gjennomsnitt (variasjonsområde) | | Variasjonsområde referansesorter | |
|--|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------------|----------------------------------|---------|
| | | NK603 x T25 | LH283 x PSB3274 | Min. | Maks. |
| Frøplantevitalitet (1-9) | V2-V4 | 3,5 (2-5) | 3,7 (2-6) | 1,7 | 6,0 |
| Plantetetthetvår (#/plot) | V2-V4 | 66,6 (61-70) | 65,4 (61-69) | 58,3 | 69,0 |
| Antall dager til ~50 % av plantene slipper pollen (antall dg etter planting) | Pollen-spredning | 57,5 (52-67) | 57,8 (52-67) | 54,0 | 70,0 |
| Antall dager til ~50 % av plantene blomstrer (antall dg etter planting) | Blomstring (synlige hunnblomster) | 55,4 (51-64) | 55,1 (51-64) | 53,0 | 66,7 |
| Andel grønne planter (1-9) | R6 | 7,3 (5-9) | 6,6 (4-9) | 2,3 | 8,0 |
| ”Kolbehøyde” (avstand (cm) fra basis til kolbefeste) | R2-R5 | 103,6 (72,6-132,1) | 101,3 (69,1-128,5) | 97,3 | 145,3 |
| Plantehøyde (cm) | R2-R5 | 220,2 (180,8-248,4) | 220,5 (186,9-240,3) | 212,1 | 269,0 |
| Tap av kolber (#/plot) | R6 | 0,1 (0-1) | 0,7 (0-3) | 0,0 | 1,3 |
| Legde (stilk) (#/plot) | R6 | 1,4 (0-5) | 2,5 (0-7) | 0,0 | 7,7 |
| Legde (rot) (#/plot) | R6 | 13,7 (0-34) | 16,6 (0-43) | 0,0 | 40,3 |
| Plantetetthethøst (#/plot) | R6 | 60,3 (54-66) | 60,1 (54-66) | 54,7 | 67,3 |
| Vanninnhold frø (%) | R8 | 18,1 (12,0-21,7) | 17,0 (11,8-20,3) | 14,3 | 23,7 |
| Testvekt (kg/l) | R8 | 0,74 (0,69-0,91) | 0,73 (0,71-0,76) | 0,71 | 0,80 |
| Avling (l/ha) | R8 | 13682,1 (8790,1-16681,9) | 14336,2 (9923,7-18975,4) | 12932,2 | 21347,3 |

3.4 Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag

Analyser av ernæringsmessige komponenter er i hovedsak utført i tråd med OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002). Det er påvist signifikante forskjeller mellom maisen NK603 x T25 og kontroll i enkeltparametere. Verdiene for de analyserte komponentene ligger imidlertid innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen, samt innenfor toleranseintervallene for de umodifiserte referansesortene som er inkludert i søkers dokumentasjon.

Faggruppen påpeker at søker ikke har foretatt analyser av vitamin C og furfural. Det understrekes at konsensusdokumentet i størst mulig grad skal følges når det legges fram dokumentasjon på nivåene av næringsstoffer, antinæringsstoffer og metabolitter

Faggruppen vektlegger at hoveddelen av maisforbruket i Norge er som dyrefôr og at mais til humant konsum utgjør mindre enn 1 % av energiinntaket både for voksne og barn under ett år. Daglig inntak av suktermais vil bidra med 0,5 % av daglig anbefaling for vitamin C ved inntak lik medianen (data fra Den Norske mor barn studien). Ved maisinntak på 17,5 g/dag (97,5 % persentilen) vil ca 2,6 % av daglig anbefaling for vitamin C dekkes. Når det gjelder dyrefôr ansees det naturlige vitamininnholdet i mais å være uten betydning da all mais som benyttes som fôr vitaminberikes i henhold til Mattilsynets anbefalinger. Tilsvarende angis krav til ernæringsmessig sammensetning av kornbasert barnemat i vedlegg 1 i Forskrift om bearbeidet kornbasert barnemat og annen barnemat til spedbarn og småbarn (FOR 2002-10-18 nr 1185). Faggruppen vurderer derfor at et eventuelt avvikende nivå av vitamin C i NK603 x T25 har liten ernæringsmessig betydning i Norge.

Feltforsøk over en vekstsesong viser ingen signifikante forskjeller mellom NK603 x T25 og umodifisert kontroll med hensyn på fenotypiske og agronomiske karakterer.

4 Dokumentasjon av toksisitet og allergenisitet

4.1 Toksisitet

4.1.1 Fôringsforsøk på broiler

Søknaden inneholder dokumentasjon fra et 42-dagers fôringsforsøk (Project No. MN-09-1) med hann- og hunnbroilere (Cobb x Cobb 500) (n = 100/gruppe, 50 % hann- and 50 % hunnfugler). Studien ble utført i henhold til prinsippene for U.S. EPA FIFRA (21 CFR part 58) Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies. Forsøket omfattet 800 dyr, fordelt på åtte grupper à 100 dyr. Dyrene ble fôret med fôr som inneholdt henholdsvis 60 % mais som startfôr (dag 0 til dag 21) og slutfôr (dag 22 til dag 42), der 64 % av maisen bestod av henholdsvis NK603 x T25, en umodifisert kontrollsort (LH283 x PSB3274) og seks kommersielle, umodifiserte referansesorter. Fôret ble undersøkt for en rekke ernæringsmessige komponenter, mykotoksiner, mineraler og antinæringsstoffer. Det ble ikke foretatt målinger av nivået av CP4 EPSPS- og PAT-proteiner. Følgende parametere ble undersøkt: mortalitet, vektøkning, føreffektivitet, vekt av skrott, bryst, lår, vinger, og abdominalt fett, samt vann-, protein- og fettinnhold i bryst og lår (% av kroppsvekt til levende broilere). I henhold til søkers dokumentasjon er effekt av fôr/kjønn, analyse for hvert kjønn ved 5 % signifikansnivå og fôring med NK603 x T25 sammenlignet med kontroll og referansesortene undersøkt ved hjelp av variansanalyse (ANOVA). Søker hevder at det ble ikke påvist relevante biologiske endringer i de målte parametrene ved fôring med mais fra NK603 x T25 sammenlignet med kontroll og referansesorter. Det er imidlertid påvist samspill mellom kjønn og fôr for enkelte av de målte parametrene.

4.2 Allergenisitet

Undersøkelser av allergent potensiale av er utført i henhold til anbefalinger fra Codex (2003) og FAO/WHO (2000, 2001). Sammenligning av et proteins aminosyresekvens med aminosyresekvensen til et kjent allergent protein er en nyttig indikator på allergent potensiale. Aminosyresekvensen til de fleste viktige allergener, deriblant matallergener, er kjent. De viktige IgE-bindingsepitopene, dvs. aminosyresekvenser på 8-12 aminosyrer (noen ganger færre) der IgE binder seg, er kartlagt for mange allergener. Eksakt konservering av epitopesequenser er påvist mellom homologe allergener i forskjellige arter. Når det gjelder proteinene CP4 EPSPS og PAT ble det ikke funnet signifikant sekvenshomologi på 8 eller større aminosyresekvenser med allergene proteiner.

Allergene proteiner i mat er ofte varme- og syrestabile. Matallergenene er oftest, men ikke alltid, stabile overfor mage- og tarmsafter. Allergene matproteiner er ofte de proteinene som forekommer i størst mengde i matvarer. Typiske mengder er fra 1-80 % av proteininnholdet. Konsentrasjonen av proteinene CP4 EPSPS og PAT i korn er henholdsvis $\approx 0,007$ % og $\approx 0,0005$ % av totalt proteininnhold i maiskorn, og utgjør således en svært liten del av det totale proteininnholdet. Tester som er dokumentert i andre søknader viser at CP4 EPSPS- og PAT-proteinene i simulert mage- og tarmsaft brytes ned i løpet av ca. 30 sekunder. Det antas derfor at proteinene også brytes raskt ned i menneskets mage- og tarmkanal.

Basert på de testene som er omtalt, dvs. at CP4 EPSPS- og PAT-proteinene ikke har noen aminosyresekvenser som har likhet med allergene proteiners epitoper, at proteinet brytes raskt ned av mage-tarmsafter, at andel av totalt proteininnhold er ca 0,01 %, anser faggruppen det som lite trolig at proteinene CP4 EPSPS og PAT har større potensiale for å gi utvikling av matallergi hos mennesker enn det som umodifisert mais har.

Faggruppen konkluderer med at proteinene CP4 EPSPS og PAT sannsynligvis ikke er mer allergene eller toksiske enn de respektive villtype-proteinene.

4.3 Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag

CP4 EPSPS- og PAT-proteinene som uttrykkes som følge av genmodifiseringen, har ingen likheter med kjente toksiner og allergener, eller egenskaper som tilsier at det vil virke som et allergen eller toksin. Innholdet av disse proteinene i korn er ca 0,01 % av totalt protein, og utgjør således en svært liten del av det totale proteininnholdet. Faggruppen finner det lite sannsynlig at eksponering av CP4 EPSPS- og PAT-proteinene i seg selv og i de mengder som tilføres via genmodifisert mais er helsemessig betenkelig. Akutt føringstudier (oral sondeføring) på mus med bakterieframstilt CP4 EPSPS- og PAT-proteiner viste ingen negative helseeffekter. Videre konkluderer ernæringsstudier med broilere med at maishybriden NK603 x T25 er ernæringsmessig lik umodifisert mais.

Resultater fra sub-kroniske føringforsøk på rotter som er dokumentert i andre søknader, viser ingen skadelige helseeffekter ved føring med fôr som inneholder NK603 og T25.

5 Miljørisikovurdering

Monsanto Companys søknad om godkjenning av maishybriden NK603 x T25 under EU forordning 1829/2003/EF omfatter bruksområdene fôrvarer, næringsmidler, import og prosessering. Søknaden gjelder ikke dyrking. Miljørisikovurderingen av den transgene maishybriden 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.

5.1 Potensiale for utilsiktede effekter på fitness relatert til genmodifiseringen

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

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

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

Herbicidtoleranse kan bare betraktes å være en selektiv fordel for den transgene planten på arealer der det benyttes herbicider med virkestoff glyfosat eller glufosinat ammonium. 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 NK603 x T25 vil medføre økt fitness, og økt evne til overvintring eller etablering av ugraspopulasjoner utenfor dyrkingsmiljø i forhold til konvensjonelle maissorter.

5.2. Potensiale for genoverføring

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

5.2.1 Horisontal genoverføring

Data fra tilgjengelige eksperimentelle studier viser at genoverføring fra transgene planter til bakterier etter all sannsynlighet inntreffer svært sjelden under naturlige forhold, og at denne overføringen forutsetter sekvenshomologi mellom overført DNA og bakterien (EFSA 2004, 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 NK603 x T25 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). 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. De innsatte genene i planten har sin opprinnelse fra jordbakterier og sekvenshomologi vil derfor være stor i forhold til disse. I hvilken grad det forekommer tilfeldig sekvenshomologi mellom plantetransgener og andre naturlig forekommende bakterier er usikkert, men siden de fleste transgenene inneholder rekombinerte DNA sekvenser fra jordbakterier kan dette ikke utelukkes (Bensasson *et al.* 2004)

Med bakgrunn i opprinnelse og karakter/egenskaper av de innsatte genene og mangel på seleksjonspress i fordøyelseskanal og/eller miljøet, er sannsynligheten for at horisontal genoverføring vil gi selektive fordeler eller økt fitness på mikroorganismer svært liten (Nielsen 2003). Det er derfor usannsynlig at gener fra NK603 x T25 vil etableres stabilt i genomet til mikroorganismer i miljøet eller i fordøyelseskanalen hos mennesker eller dyr. Ut fra tilgjengelig kunnskap og begrensninger i metodikk (Nielsen & Townsend 2004) kan det ikke utelukkes at horisontal genoverføring vil skje.

5.2.2 Vertikal genoverføring

Potensialet for krysspollinering mellom maishybrid NK603 x T25 og konvensjonelt foredlete maissorter vil avhenge av omfanget av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport, håndtering og prosessering. Det er imidlertid lite sannsynlig at sporadiske enkeltplanter vil spre signifikante mengder pollen til konvensjonelle dyrkingsfelt. Dyrkingsomfanget av mais i Norge er dessuten svært begrenset. Risiko for utkryssing med dyrkede sorter vurderes derfor til å være ubetydelig.

Herbicidtoleranse kan bare betraktes å være en selektiv fordel på arealer der det benyttes herbicider med de aktuelle virkestoffene. Denne egenskapen vil imidlertid ikke representere økt sannsynlighet for spredning av mais i Europa. Overlevelse hos mais er i hovedsak begrenset av dårlig konkurransevne, manglende frøkvile, mottagelighet for soppsjukdommer og liten frosttoleranse. Som for konvensjonelle sorter er det ingenting som tilsier at eventuelle spillplanter vil overleve til neste vekstsesong eller etablere uønskede populasjoner i Norge.

Tatt i betraktning tiltenkt bruksområde for maishybriden, vil miljøeksponeringen være begrenset til sporadiske enkeltplanter fra frøspill i forbindelse med transport og prosessering.

5.2 Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag

Søknaden gjelder godkjenning av maishybriden NK603 x T25 for import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av maishybriden. 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 maishybriden i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Norge er i utkanten av dyrkingsområdet for mais, dyrkingsomfanget er svært begrenset og det er ingen stedegne eller introduserte viltvoksende arter som mais kan hybridisere med.

6 Vurdering av søkers dokumentasjon

Faggruppen finner at søkers informasjon i stor grad følger OECDs retningslinjer, og er tilstrekkelig til at det er mulig å foreta en vurdering av den foreliggende GMO. Faggruppen påpeker imidlertid at det mangler analyser av furfural og C-vitamin, komponenter som OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002) anbefaler analysert.

7 Innspill til EFSA GMO Extranet søknad EFSA/GMO/NL/2010/80

Ingen innspill fra Faggruppe for genmodifiserte organismer i forbindelse med EFSA's offentlige høring av søknad EFSA/GMO/NL/2010/80.

Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag

Komparative analyser

Analyser av ernæringsmessige komponenter er i hovedsak utført i tråd med OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002). Det er påvist signifikante forskjeller mellom maisen NK603 x T25 og kontroll i enkeltparametere. Verdiene for de analyserte komponentene ligger imidlertid innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen, samt innenfor toleranseintervallene for de umodifiserte referansesortene som er inkludert i søkers dokumentasjon.

Faggruppen påpeker at søker ikke har foretatt analyser av vitamin C og furfural. Det understrekes at konsensusdokumentet i størst mulig grad skal følges når det legges fram dokumentasjon på nivåene av næringsstoffer, antinæringsstoffer og metabolitter

Faggruppen vektlegger at hoveddelen av maisforbruket i Norge er som dyrefôr og at mais til humant konsum utgjør mindre enn 1 % av energiinntaket både for voksne og barn under ett år. Daglig inntak av sukkermais vil bidra med 0,5 % av daglig anbefaling for vitamin C ved inntak lik medianen (data fra Den Norske mor barn studien). Ved maisinntak på 17,5 g/dag (97,5 % persentilen) vil ca 2,6 % av daglig anbefaling for vitamin C dekkes. Når det gjelder dyrefôr ansees det naturlige vitamininnholdet i mais å være uten betydning da all mais som benyttes som fôr vitaminberikes i henhold til Mattilsynets anbefalinger. Tilsvarende angis krav til ernæringsmessig sammensetning av kornbasert barnemat i vedlegg 1 i Forskrift om bearbeidet kornbasert barnemat og annen barnemat til spedbarn og småbarn (FOR 2002-10-18 nr 1185). Faggruppen vurderer derfor at et eventuelt avvikende nivå av vitamin C i NK603 x T25 har liten ernæringsmessig betydning i Norge.

Feltforsøk over en vekstsesong viser ingen signifikante forskjeller mellom NK603 x T25 og umodifisert kontroll med hensyn på fenotypiske og agronomiske karakterer.

Toksisitet og allergenitet

CP4 EPSPS- og PAT-proteinene som uttrykkes som følge av genmodifiseringen, har ingen likheter med kjente toksiner og allergener, eller egenskaper som tilsier at det vil virke som et allergen eller toksin. Innholdet av disse proteinene i korn er ca 0,01 % av totalt protein, og utgjør således en svært liten del av det totale proteininnholdet. Faggruppen finner det lite sannsynlig at eksponering av CP4 EPSPS- og PAT-proteinene i seg selv og i de mengder som tilføres via genmodifisert mais er helsemessig betenkelig. Akutte 14-dagers fôringsstudier (oral sondefôring) på mus med bakterieframstilt CP4 EPSPS- og PAT-proteiner viste ingen negative helseeffekter. Videre konkluderer ernæringsstudier med broilere at maishybriden NK603 x T25 er ernæringsmessig lik umodifisert mais.

Resultater fra sub-kroniske fôringsforsøk på rotter som er dokumentert i andre søknader, viser ingen skadelige helseeffekter ved fôring med fôr som inneholder NK603 og T25.

Landbruksrelatert miljørisiko

Søknaden gjelder godkjenning av maishybriden NK603 x T25 for import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av maishybriden. 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 maishybriden i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Norge er i utkanten av dyrkingsområdet for mais, dyrkingsomfanget er svært begrenset og det er ingen stedeagne eller introduserte viltvoksende arter som mais kan hybridisere med.

Referanser

- Bensasson, D., Boore, J.L. & Nielsen, K.M. (2004). Genes without frontiers. *Heredity*, **92**, 483-489.
- CERA (2010). The Center for Environmental Risk Assessment (CERA).
http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database
- Codex (2003). Codex Alimentarius Commission, Alinorm 03/34: Joint FAO/WHO Food Standard Programme, Codex Alimentarius Commission, Twenty-Fifth Session, Rome, Italy, 30 June- 5 July, 2003.
- Collonnier, C., Schattner, A., Berthier, G., Boyer, F., Coue-Philippe, G., Diolez, A., Duplan, M.N., Fernandez, S. & Kebdani, N. (2005). Characterization and event specific-detection by quantitative Real-Time PCR of T25 Maize insert. *JAOAC Int.*, **88**, 536-546.
- 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.
- Eckes, P. (1994). *Transcription of the bacterial Ampicillin resistance gene in Glyphosate tolerant maize lines T14 and T25*. Report/Study AgrEvo No Ec94.01. 5p. Upublisert.
- EFSA (2004a). 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 (2004b). Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the Austrian invoke of Article 23 of Directive 2001/18/EC. *The EFSA Journal*, **78**, 1-13. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/78.htm>
- EFSA (2006a). *Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed*. 100 s. http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_guidance/660.html
- EFSA (2006b). Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to genetically modified crops (Bt176 maize, T25 maize, T25 maize, Topas 19/2 oilseed rape and Ms1xRf1 oilseed rape) subject to safeguard clauses invoked according to Article 16 of Directive 90/220/EEC. *The EFSA Journal*, **338**, 1-5. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/338.htm>
- EFSA (2007). Guidance Document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants containing stacked transformation events. *The EFSA Journal*, **512**, 1-5. http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178623591786.htm
- EFSA (2009a). 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_Consolidated_ARG_en.pdf?ssbinary=true
- EFSA (2009b). Applications (references EFSA-GMO-NL-2005-22, EFSA-GMO-RX-NK603) for the placing on the market of the genetically modified glyphosate tolerant maize NK603 for cultivation, food and feed uses, import and processing and for renewal of the authorisation

- of maize NK603 as existing products, both under Regulation (EC) No 1829/2003 from Monsanto. *The EFSA Journal*, **1137**, 1-50.
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1137.htm>
- EHC (1999). *Bacillus thuringiensis*. Environmental Health Criteria Monograph 217, International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, 1999.
- FAO/WHO (2000). Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- FAO/WHO (2001). *Evaluation of allergenicity of genetically modified foods*. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on foods derived from biotechnology. 22-25 January 2001. Rome: Food and Agriculture Organisation of the United Nations
(<http://www.fao.org/es/esn/gm/allergygm.pdf>)
- Filipecki, M. & Malepszy, S. (2006). Unintended consequences of plant transformation: a molecular insight. *Journal of Applied Genetics*, **47**: 277-286.
- Franck, A., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K. & Hirth, L. (1980). Nucleotide sequence of Cauliflower mosaic virus DNA. *Cell*, **21**, 285-294.
- Hara, O., Murakami, T., Imai, S., Anzai, H., Itoh, R., Kumada, Y., Takano, E., Satoh, E., Satoh, A., Nagaoka, K. & Thompson, C. (1991). The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces viridochromogenes*: cloning, heterospecific expression, and comparison with the genes of *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of General Microbiology*, **137**, 351-359.
- Hallauer, A.R. (2000). Potential for outcrossing and weediness of genetically modified insect protected corn. APHIS-USDA.
- ILSI (2007). International Life sciences Institute Crop Composition Database Version 3.0. URL: <http://www.cropcomposition.org>
- Kohli, A., Leech, M., Vain, P., Lauri, D.A. & Christou, P. (1998). Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. *PNAS*, **95**, 7203-7208.
- Lid, J. & Lid, D.T. (2005). Norsk flora. Det Norske Samlaget, Oslo. 7. utgave. ISBN: 82-521-6029-8. 1230s.
- Liu, J., Song, F, Zhang, J., Liu, R., He, K., Tan, J., & Huang, D. (2007) Identification of *vip3A*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel *vip3A*-type gene. *Lett. Appl. Microbiology*, **45(4)**, 432-438.
- Mórocz, S., Donn, G., Németh, J. & Dudits, D. (1990). An improved system to obtain fertile regenerants via maize protoplasts isolated from a highly embryogenic suspension culture. *Theoretical Applied Genetics*, **80**, 721-726.
- Netherwood, T., Martín-Orúe, S.M., O'Donnell, A.G., Gockling, S., Graham, J., Mathers, J.C. & Gilbert, H.J. (2004). Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nature Biotechnology*, **22**, 204-209.
- Nielsen, K.M., van Elsas, J.D. & Smalla, K. (2000). Transformation of *Acinetobacter* sp. 13(pFG4delta*nanptII*) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Applied Environmental Microbiology*, **66**, 1237-42.

- Nielsen, K.M. (2003). An assessment of factors affecting the likelihood of horizontal transfer of recombinant plant DNA to bacterial recipients in the soil and rhizosphere. *Collection of Biosafety Reviews*, **1**, 96-149.
- Nielsen, K.M. & Townsend, J. P. (2004). Monitoring and modeling horizontal gene transfer. *Nature Biotechnology*, **22**(9):1110-1114
- OECD (1998). OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. Number 1. ENV/MC/CHEM (98)17.
[http://www.olis.oecd.org/olis/1998doc.nsf/LinkTo/NT00000C5A/\\$FILE/01E88455.PDF](http://www.olis.oecd.org/olis/1998doc.nsf/LinkTo/NT00000C5A/$FILE/01E88455.PDF)
- OECD (2002). Consensus Document on Compositional Consideration for New Varieties of Maize (*Zea Mays*): key Food and Feed Nutrients, Anti-nutrients and Secondary Plant Metabolites, No. 6, series on Safety of Novel Foods and Feeds.
- OECD (2003). Consensus Document on the biology of *Zea mays* subsp. *Mays* (Maize). *Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology (ENV/JM/MONO, No. 27*, 1-49.
- Schubbert, G.W., Lettmann, C. & Doerfler, W. (1994). Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Molecular & general Genetics*, **242**, 495-504.
- Siehl, D.L., Castle, L.A., Gorton, R., Chen, Y.H., Bertain, S., Cho, H-J., Keenan, R., Liu, D. & Lassner, M.W. (2005). Evaluation of a microbial acetyltransferase for modification of glyphosate: a novel tolerance strategy. *Pest Management Science*, **61**, 235-240.
- TemaNord (1998). *Safety Assessment of Novel Food Plants: Chemical Analytical Approaches to the Determination of Substantial Equivalence*. TemaNord 1998:591. ISBN 92-893-0263-1.
- US EPA 40 CFR PART 160. USA Environmental Protection Agency Good Laboratory Practices - 40 CFR Part 160
<http://www.epa.gov/compliance/monitoring/programs/fifra/glp.html>
- van Wert, S. (1994). Petition for determination of nonregulated status: Glufosinat resistant corn transformation event T14 and T25. 23 December 1994. Upublisert.
- van Wijk, F. & Knippels, L. (2007). Initiating mechanisms of food allergy: oral tolerance versus allergic sensitization. *Biomed. Pharmacother.*, **61**, 8–20.
- VKM (2005a). *Helserisikovurdering av genmodifisert mais Roundup Ready NK603 (C/EC/00/01) etter forordning 1829/2003. Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer 4.03.05 (05/307)*. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.
http://www.vkm.no/eway/default.aspx?pid=277&trg=Content_6556&Main_6177=6556:0:&Content_6556=6187:1663876:0:6720:12::0:0
- VKM (2005b). *Report from an Ad Hoc Group appointed by the Norwegian Scientific Panel on Genetically Modified Organisms and Panel on Biological Hazards – An assessment on potentially long-term health effects caused by antibiotic resistance marker genes in genetically modified organisms based on antibiotic usage and resistance patterns in Norway*. Opinion 05/302-1-final. Norwegian Scientific Committee for Food Safety, Oslo, Norway. 62 p.
- VKM (2007a). *Vurdering av Avensis CropScience genmodifiserte mais T25 (C/F/95/12/07). Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer*. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, EFSA/GMO/NL/2010/80 – NK603 x T25

Norge.

http://www.vkm.no/eway/default.aspx?pid=277&trg=Content_6556&Main_6177=6556:0:&Content_6556=6187:1663902::0:6720:4:::0:0

VKM (2007b). *Miljøriskovurdering av genmodifisert maislinje T25 fra Bayer CropScience (C/F/95/12-07). Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer 14.11.07. (07/321). Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.*
http://www.vkm.no/eway/default.aspx?pid=277&trg=Content_6556&Main_6177=6556:0:&Content_6556=6187:1664113::0:6720:3:::0:0

VKM (2008). *Helse- og miljørisikovurdering av genmodifisert maislinje T25 fra Bayer Crop Science (EFSA/GMO/NL/2007/46). Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer 16.10.08 rev. 20.01.09 (08/329). Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.*
http://www.vkm.no/eway/default.aspx?pid=277&trg=Content_6556&Main_6177=6556:0:&Content_6556=6187:1670945::0:6720:2:::0:0

VKM (2009). *Helse- og miljørisikovurdering av genmodifisert maislinje T25 fra Bayer Crop Science (EFSA/GMO/RX-T25). Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer 21.01.09. (09/304). Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.*
http://www.vkm.no/eway/default.aspx?pid=277&trg=Content_6556&Main_6177=6556:0:&Content_6556=6187:1671368::0:6720:1:::0:0