



**Helse- og miljørisikovurdering
genmodifisert maishybrid MIR604 x GA21 fra
Syngenta Seeds Inc.
(EFSA/GMO/UK/2007/48)**

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

3.04.09

VKM Report 2009: 19

BIDRAGSYTERE

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

VURDERT AV

Faggruppe for genmodifiserte organismer:

Knut Berdal (leder), Jihong Liu Clarke, Helge Klungland, Casper Linnestad, Anne I. Myhr, Audun Nerland, Ingolf Nes, Kåre M. Nielsen, Hilde-Gunn Opsahl Sorteberg, Odd E. Stabbetorp, Vibeke Thrane,

Koordinator fra sekretariatet:

Arne Mikalsen, Merethe Aasmo Finne

SAMMENDRAG

Helse- og miljørisikovurderingen av den herbicid- og insektsresistente maishybriden MIR604 x GA21 fra Syngenta (EFSA/GMO/UK/2007/48) er utført av Faggruppe for genmodifiserte organismer under Vitenskapskomiteen for mattrygghet. Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning (DN) ber Vitenskapskomiteen for mattrygghet om å vurdere den genmodifiserte maislinjen MIR604 x GA21 til bruk i næringsmidler og fôrvarer, men ikke for dyrking.

Vurderingen av den genmodifiserte maisen er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSAAs nettside GMO EFSAAnet. I tillegg er det benyttet informasjon fra uavhengige vitenskapelige publikasjoner i vurderingen. MIR604 x GA21 er risikovurdert i henhold til tiltenkt bruk i EU/EØS-området, og faggruppen har derfor ikke vurdert mulige helse- og miljøeffekter knyttet til dyrking av maishybriden. Vurderingen er gjort i overensstemmelse med kravene i genteknologiloven, forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven, forordning 1829/2003/EF, samt kravene i EUs utsettingsdirektiv 2001/18/EF med annekser. Videre er EFSAAs retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter (EFSA 2006) og Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) konsensusdokument for mais (OECD 2002) lagt til grunn for vurderingen.

Den vitenskapelige vurderingen omfatter transformeringsprosess og vektorkonstruksjon, karakterisering og nedarving av genkonstruksjonen, komparativ analyse av ernæringsmessig kvalitet, vitaminer, mineraler, kritiske toksiner, metabolitter, antinæringsstoffer, allergener og nye proteiner. Videre er agronomiske egenskaper, potensiale for ikke-intenderte effekter på fitness, genoverføring og effekter på ikke-målorganismer vurdert.

Maishybriden MIR604 x GA21 er resultat av konvensjonell kryssing mellom foreldrelinjene MIR604 og GA21. Begge foreldrelinjene er tidligere vurdert av Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM 2005a,b, 2009).

Foreldrelinjen MIR604 har fått innsatt et modifisert *cry3A*-gen (*mcry3A*) fra *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* og genet *pmi* fra *E. coli*. *mCry3A* genet uttrykker δ -endotoksinet mCry3A, som gir plantene toleranse mot angrep fra bladbiller i slekten *Diabrotica*. *Pmi* genet uttrykker enzymet fosfomannose isomerase, som gir toleranse overfor sukkerarten mannose.

Foreldrelinjen GA21 er fremkommet ved biolistisk transformasjon av embryonale maisceller fra en ikke navngitt maislinje. Den innsatte genkonstruksjonen inneholder et endogent 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfatsyntetase (*mepsps*)-gen, som er modifisert ved hjelp av *in vitro*-mutagenese. *Mepsps*-genet koder for enzymet 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfatsyntetase (mEPSPS), som omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfat, viktige metabolitter i syntesen av aromatiske aminosyrer. N-fosfonometylglycin er et systemisk, ikke selektivt herbicid som hemmer EPSPS-enzymet og derved blokkerer biosyntesen av aromatiske aminosyrer i planter. I motsetning til plantens EPSPS-enzym er det modifiserte mEPSPS-enzymet fra mais også aktivt ved nærvær av glyfosat.

Syngenta har ikke foretatt analyser av hybridene MIR604 x GA21 med hensyn på ernæringsmessige komponenter, sekundære metabolitter eller antinæringskomponenter, men henviser til undersøkelser av trippelhybriden Bt11 x MIR604 x GA21 (EFSA/GMO/UK/2008/56). I følge EFSAAs retningslinjer for risikovurdering av hybrider med 'stabilede egenskaper' (EFSA 2007) er dette tilfredsstillende så lenge hybridene med høyest antall transgener er risikovurdert. Søknad EFSA/GMO/UK/2008/56 ble imidlertid fremmet på et seinere tidspunkt, og fullstendig dokumentasjon knyttet til Bt11xMIR604xGA21 var ikke tilgjengelig i forbindelse med risikovurdering av hybridene MIR604 x GA21.

Det er ikke utført 13 ukers fôringsforsøk med hybridene MIR604 x GA21 eller Bt11 x MIR604 x GA21. Faggruppen konkluderer derfor med at søker ikke i tilstrekkelig grad har vurdert om det foreligger potensiale for økt toksisitet sammenlignet med umodifisert mais.

Flere studier viser at proteinene mEPSPS og PMI ikke er akutt toksiske. Faggruppen konkluderer med at det er lite sannsynlig at eksponering for proteinene i seg selv og i de mengder som tilføres via genmodifisert mais, er helsemessig betenkelig.

Ingen av proteinene mCry3A og mEPSPS har likheter med kjente allergener eller egenskaper som tilsier at de er allergener. Det er imidlertid ikke vurdert om det uttrykte toksinet mCry3A kan ha adjuvanseffekter, d.v.s. fremming av immunreaksjon mot andre stoffer

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

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

En samlet faggruppe finner at mat- og fôrprodukter fra MIR604 x GA21, som ikke inneholder Cry-proteiner, eksempelvis oljebaserte produkter, ikke medfører endret risiko for helse i forhold til annen mais.

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

Samlet vurdering

Faggruppe for genmodifiserte organismer finner det ikke godtgjort at bruk av maislinjen Bt11 x GA21 ikke vil medføre endret risiko for helse i forhold til annen mais. Faggruppen påpeker også at det er kunnskapshull knyttet til om Cry-proteinet i MIR604 x GA21 kan virke som adjuvant.

Faggruppen finner det lite trolig at den omsøkte bruken av MIR604 x GA21 vil medføre endret risiko for miljø i forhold til annen mais.

NØKKELORD

Genmodifisert mais, MIR604 x GA21, insektsresistens, herbicidtoleranse, mCry3A-protein, *mcry3A*-gen, mEPSPS-protein, *mepsps*-gen, helsemessig trygghet, helse, adjuvans, miljø, forordning 1829/2003/EF, direktiv 2001/18/EF

FORKORTELSER OG ORDFORKLARINGER

ADF	Aid detergent fiber, fiberfraksjon av ufordøyelig plantemateriale i fôr, vanligvis cellulosefiber dekket med lignin og silikat. Plantematerialet fordøyes med en syre-detergentløsning (ADF). Ufordøyd masse betegnes som ADF. Fôr med lavt ADF-innhold er mer fordøyelig og har større energiinnhold.
Allel	Et bestemt gen kan foreligge i ulike varianter (alleler). Allelene kan være dominante (bestemmende for fenotypen) eller recessive (vikende).
ARMG	Atibiotikaresistensmarkørgen
Backcross (BC)	Tilbakekryssing. Kryssing mellom en hybridlinje (avkom fra to genetisk ulike foreldre) og en av foreldrelinjene, alternativt en genetisk ekvivalent organisme. Strategi i planteforedling for å overføre primært kvalitative karakterer, for eksempel sjukdomsresistens, til elitelinjer av både kryssbefruktede og selvpollinerte arter. Gjentatte tilbakekryssinger reduserer det genetiske bidraget, som uønskede alleler fra den andre donorplanten. BC ₁ , BC ₂ etc: betegnelse på 1. og 2. tilbakekryssingsgenerasjon, etc.
BLASTn	Agoritme som benyttes for homologisammenligning av nukleotidsekvenser.
BLASTP	Agoritme som benyttes for homologisammenligning av aminosyresekvenser i proteiner.
BLASTx	Agoritme som benyttes for oversetting fra kodende nukleotidsekvenser til aminosyresekvenser.
<i>B.t.</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
bp	Basepar
Codex	FAO/WHO-organ som etablerer globale handelsstandarder for mat.
Cry	Krystallproteiner fra <i>Bacillus thuringiensis</i> .
Cry3	En klasse av <i>B.t.</i> -krystallproteiner med effekt mot arter i ordenen Coleoptera (biller).
DN	Direktoratet for naturforvaltning
DNA	Doxyribonukleinsyre (DNA)
Dominant allel	Et allel som uttrykker same fenotype, uavhengig av om allelene i genparet er like (homozygot) eller ulike (heterozygote).
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPSPS	5-enolpyruvylsukinat-3-fosfat-syntetase
FAO	Food and Agriculture Organization, FN's organisasjon for ernæring og landbruk
FIFRA	US EPA Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act. USAs føderale lov om insektdrepende midler, soppdrepende midler og midler mot skadedyr
Fitness	Et individs relative evne til å føre sine gener/alleler videre til kommende generasjoner
GenBank	Database som inneholder nukleotidsekvenser, se NCBI. Per januar 2009 inneholder databasen mer enn 61 millioner sekvenser.
GLP	Good Laboratory Practices, retningslinjer for godt laboratoriearbeid.
Glyfosat	Bredspektret herbicid
GMO	Genmodifisert organisme
GMP	Genmodifisert plante
Herbicid	Ugrasmiddel
Intron	Ikke-kodende områder i et eukaryot gen.
Locus	Spesifikk posisjon på kromosomet der et gen er lokalisert
MALDITOF	Massespektrometrimetode for å måle molekylvekt til peptider
Mendelsk nedarving	Lovmessig nedarvingsmønster ved ulike typer kryssinger.
mEPSPS	5-enolpyruvylsukinat-3-fosfat-syntetase
MT	Mattilsynet

NCBI	National Center for Biotechnology Information (NCBI) er en del av USAs National Library of Medicine (NLM), som er en gren av National Institutes of Health (NIH). NCBIs database huser genomsekvensdata i GenBank.
NDF	Neutral detergent fiber, dvs. fiberfraksjon som inneholder hemicellulose og ADF.
Northern blot	Teknikk for overføring av RNA til en membran for videre studier av overførte RNA-sekvenser.
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)
Promoter	En molekylærbiologisk promoter inneholder DNA-sekvenser som binder enzymet RNA polymerase. RNA polymerase fører til syntese av mRNA fra DNA, dvs. omskriving (transkribering) av DNA til mRNA.
PAT	Phosphinothricin Acetyl-transferase protein
PCR	Polymerase chain reaction. Polymerase kjedereaksjon. Metode for å lage mange kopier av en DNA-sekvens vha primere.
Rekombinant DNA	Kombinasjon av DNA sekvenser som normalt ikke opptrer sammen, dvs. DNA-fragmenter(gen, promoter, terminator etc.) fra flere forskjellige kilder (f.eks. bakterier, planter) som skjøtes sammen.
RNA	ribonukleinsyre
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat (SDS)-polyakrylamidelektroforese. Elektroforetisk metode for separasjon av proteiner.
Southern blot	Teknikk for overføring av DNA til en membran for påvisning av spesifikke DNA-sekvenser.
T-DNA	DNA fra Ti-plasmidet som er i jordbakterien <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Ti-plasmidet inneholder virulensgener som gjør at et enkelttrådig stykke av Ti-plasmidet, kalt T-DNA (transfer-DNA), overføres fra bakterien og settes inn i plantecellenes kjernegenom. Ti-DNAet inneholder V (venstre) - og H (høyre)-flankesekvenser som fører til integrering i genomet.
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
Vektor	En molekylærbiologisk vektor (kloningsvektor) er et kunstig fremstilt DNA-molekyl som benyttes for å overføre genetisk materiale til en celle. De fire hovedtypene av vektorer er plasmider, bakteriofager og andre virus, kosmider og kunstige kromosomer.
Western-blot	Metode for overføring av proteiner til en membran som binder protein.
WHO	World Health Organisation. Verdens helseorganisasjon, organ under FN

INNHOLDSFORTEGNELSE

BIDRAGSYTERE	2
Vurdert av.....	2
SAMMENDRAG.....	3
NØKKEWORD	4
FORKORTELSER OG ORDFORKLARINGER.....	5
INNHOLDSFORTEGNELSE	7
BAKGRUNN	8
OPPDRAK FRA DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING OG MATTILSYNET	8
RISIKOVURDERING	10
1. Innledning.....	10
1.1. Beskrivelse av egenskaper(er) og virkningsmekanismer	10
2. Molekylær karakterisering	11
2.1. Hybridproduksjon	11
2.2. Evaluering av foreldrelinjer	11
3. Komparative analyser.....	17
3.1. Valg av komparator og forsøksdesign	17
3.2. Analyser av ernæringsmessige komponenter Bt11 x MIR604 x GA21	17
3.3. Agonomiske egenskaper.....	19
3.4. Delkonklusjon	19
4. Dokumentasjon av toksisitet og allergenisitet.....	19
4.1. Toksisitet.....	19
4.2. Allergenisitet.....	20
4.3. Delkonklusjon	21
5. Miljøriskovurdering	22
5.1. Potensiale for ikke tilsiktede effekter på fitness relatert til genmodifiseringen	22
5.2. Potensiale for genoverføring.....	23
5.3. Potensiale for samspill mellom GMP og målorganismer	24
5.4. Potensiale for samspill mellom GMP og ikke-målorganismer	24
5.5. Potensiale for samspill med abiotisk miljø og eventuelle effekter på	24
biogeokjemiske prosesser	24
5.6. Delkonklusjon	24
6. Vurdering av søkers dokumentasjon	25
KONKLUSJON	26
Referanser.....	28

BAKGRUNN

Faggruppe for genmodifiserte organismer under Vitenskapskomiteen for mattrygghet er blitt bedt av Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning om å foreta en utredning av helse- og miljørisiko ved en eventuell godkjenning av den genmodifiserte maislinjen MIR604 x MIR604 fra Syngenta Seeds Inc. (EFSA/GMO/UK/2007/48). 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 britiske myndigheter i november 2007. Dokumentasjonen knyttet til søknaden ble lagt ut på EFSA-nett 12. mars 2008, med frist på 90-dager for innspill fra EU- og EØS/EFTA-landene.

Foreldrelinjen MIR604 er søkt godkjent til import, prosessering, mat, fôr, samt tilsetningsstoffer til mat og fôr i EU, mens GA21 er godkjent for omsetning som mat og fôr. GA21 er notifisert som eksisterende produkt under forordning 1829/2003/EF, artikkel 8 og 20, til bruk som mat, fôr, samt tilsetningsstoffer til mat og fôr, og søkt godkjent for dyrking i EU/EØS-området. I Norge ble GA21 innmeldt som prosessert fôrvare under den nasjonale overgangsordningen for eksisterende GM-produkter 15. mars 2006 (jfr fôrvareforskriftens § 7a), og var tillatt å omsette på det norske markedet fram til 15. september 2008. Det er foreløpig uklart om overgangsordningen forlenges i påvente av innlemmelse av EUs rettsakter i EØS-avtalen. Notifiseringen gjelder fôrvarer til både landdyr og til oppdrettsfisk.

http://www.mattilsynet.no/mattilsynet/multimedia/archive/00034/Tillatte_eksisterend_34512a.pdf

Norge har ikke tidligere uttalt seg om maishybriden. Begge foreldrelinjene er tidligere vurdert av Faggruppe for genmodifiserte organismer (VKM 2005a,b, 2009).

Utenfor EU/EØS-området er MIR604 x GA21 godkjent til bruk som mat og fôrvare på Filippinene og Mexico, samt dyrking og mat i Japan (Agbios 2009).

OPPDRAG FRA DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING OG MATTILSYNET

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

Søknad EFSA/GMO/UK/2007/48, genmodifisert maishybrid MIR604 x GA21, ble lagt ut på EFSA-nett 12. mars 2008. Faggruppe for genmodifiserte organismer skal i tråd med oppdragsbrev utarbeide helse- og miljørisikovurdering av maishybriden MIR604 x GA21 til import og industriell prosessering, samt til bruk som næringsmiddel og fôrvare. Søknaden omfatter ikke dyrking.

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

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

Produktet som ønskes vurdert:

Genmodifisert mais, EFSA/GMO/UK/2007/48 (MIR604 x GA21).

Unik kode: SYN-IR604-5 x MON-ØØØ21-9.

Status i EU: Søknad under 1829/2003/EF. EFSA's frist for innspill er 12.06.08.

Ønsket svarfrist til Mattilsynet/DN: 12. juni 2008.

RISIKOVURDERING

1. Innledning

Helse- og miljørisikovurderingen av den genmodifiserte maishybriden MIR604 x GA21 er basert på informasjon som er gjort tilgjengelig på EFSAAs nettside GMO EFSAAnet knyttet til søknader om godkjenning av maishybriden MIR604 x GA21 og foreldrelinjene MIR604 og GA21 (EFSA/GMO/UK/2007/48; EFSA/GMO/UK/2005/11; EFSA/GMO/UK/2005/19). I tillegg er det benyttet uavhengige vitenskapelige publikasjoner med referee i vurderingene. Vurderingene er gjort i henhold til tiltenkt bruk, og i overensstemmelse med miljø- og helsekravene i kravene i genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven. Videre er kravene i EUs forordning 1829/2003/EF og utsettingsdirektiv 2001/18/EF med annekser lagt til grunn for vurderingen.

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

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

Det er kun medlemmene i Faggruppen som har vurdert den genmodifiserte maisen.

1.1. Beskrivelse av egenskaper(er) og virkningsmekanismer

Hybriden MIR604 x GA21 er dannet ved tradisjonell kryssingsforedling mellom to innavlede linjer, avledet av de genmodifiserte maislinjene MIR604 og GA21.

Foreldrelinjen MIR604 har fått innsatt et modifisert bakterielt *cry3A*-gen (*mcry3A*) fra *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. *mCry3A*-genet er fremkommet ved endringer i basesekvensen av *cry3A*-genet, endringer som medfører optimalt uttrykk i mais. Genet er under kontroll av en maispromotor fra et metallothionein-lignende gen (*mtl*), og genet koder for et δ -endotoksin som gir maisplanter toleranse mot enkelte arter i familien bladbiller (*Chrysomelidae*), som *Diabrotica* ssp. *mCry3A*-genet uttrykker et mCry3A-protein, og gir plantene toleranse mot angrep fra bladbiller i slekten *Diabrotica*, eksempelvis *D. virgifera virgifera* ('Western Corn Rootworm') og *D. longicornis barberi* ('Northern Corn Rootworm'). Proteinene uttrykkes primært i røttene hos maisplantene. I tillegg inneholder den innsatte genkonstruksjonen et *pmi*-gen fra *Escherichia coli*. Genet koder for enzymet fosfomannose isomerase (PMI), som omdanner mannose-6-fosfat til fruktose-6-fosfat. Mannose kan derfor benyttes som karbonkilde hos planter som uttrykker *pmi*-genet, og er i denne sammenheng brukt som seleksjonsmarkør under transformasjonsprosessen. *Pmi*-genet er under kontroll av mais promotoren *ZmUbiIntron*, som uttrykkes konstitutivt i enfrøbladete planter

Foreldrelinjen GA21 er produsert ved biolistisk transformasjon av embryonale maisceller fra en ikke navngitt maislinje. Den innsatte genkonstruksjonen inneholder et endogent 5-enolpyruvylsukinat-3-fosfat-syntetase (*mepsps*)-gen, som er modifisert ved hjelp av *in vitro*-mutagenese. Det modifiserte EPSPS-enzymet i GA21 har 99,3 % sekvensidentitet med det opprinnelige genet, og skiller seg fra villtypeenzymet ved at 2 av totalt 445 aminosyrer er endret. Uttrykket av *mepsps*-genet kontrolleres av en konstitutiv risaktinpromotor.

Mepsps-genet koder for enzymet 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfatsyntetase (mEPSPS), som omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfat, viktige metabolitter i syntesen av aromatiske aminosyrer. N-fosfonometyl-glycin er et systemisk, ikke selektivt herbicid som hemmer EPSPS-enzymet og blokkerer derved biosyntesen av aromatiske aminosyrer i planter. I motsetning til plantens EPSPS-enzym er det modifiserte mEPSPS-enzymet fra mais også aktivt ved nærvær av glyfosat. De transgene plantene vil derfor tolerere høyere doser av herbicider med virkestoff glyfosat sammenlignet med konkurrerende ugras. Shikimatbiosynteseveien finnes hos planter og mikroorganismer, men ikke hos dyr.

Genkonstruksjonen inneholder også et optimalisert kloroplastoverføringspeptid (OTP), som bidrar til å målrette uttrykket av mEPSPS-proteinene til kloroplastene. Peptidsekvensene er avledet av *RuBisCo*-gener, isolert fra mais og solsikke.

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 MIR604 x GA21 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom maislinjene MIR604 og GA21.

2.2. Evaluering av foreldrelinjer

2.2.1. Maislinje MIR604

Beskrivelse av egenskaper, transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

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

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

Karakterisering av geninnsettingen

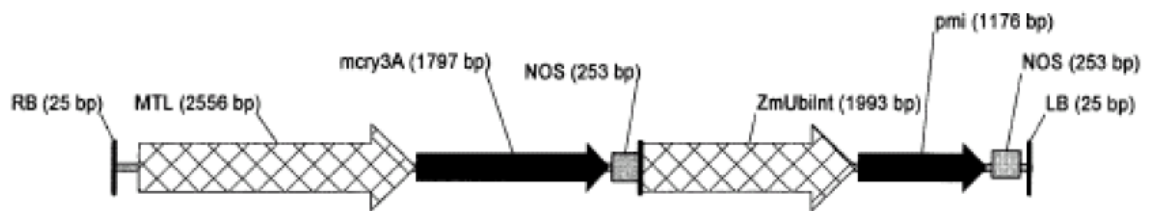
Southern blot-, TaqMan PCR- og sekvensanalyse av DNA isolert fra blad, viser at et nesten fullengde kopi av pZM26 rekombinante DNA-fragment er satt inn i maisens genom. Molekylærbiologisk karakterisering viser at det er satt inn bare en kopi av det rekombinant DNA-fragmentet i maisens genom.

Beskrivelse av de innsatte genene

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

mCry3A ekspresjonskasset

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



Figur 2. Rekombinant DNA fragment fra plasmidet pZM26.

Molekylærbiologiske analyser

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

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

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

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

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

Med unntak av pollen ble det påvist mCry3A-protein i alle undersøkte vev. I gjennomsnitt over begge vekststadier ble konsentrasjonen av mCry3A målt til 34,1 µg/g tørrvekt i blad (SD=5,1, variasjonsbredde = 28,2 – 39,7), mens innholdet i røtter, korn og hel plante ble målt til henholdsvis 17,4 µg/g tørrvekt (SD=2,1, variasjonsbredde = 12,9 – 25,5), 0,70 µg/g tørrvekt (SD= 0,094) og 15,3 µg/g tørrvekt (SD=2,7, variasjonsbredde = 11,3 – 20,0).

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

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

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

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

Delkonklusjon

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

2.2.2 Maislinje GA21

Beskrivelse av egenskaper og virkningsmekanismer

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

Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

I følge søkers dokumentasjon ble et modifisert *epsps*-gen (*mepsps*-gen) dannet ved å klonere et *epsps*-gen fra villtype-mais inn i plasmidet pDPG434 og deretter indusere to mutasjoner ved hjelp av *in vitro*-mutagenese. Mutasjonene i de kodende områder av *epsps*-genet har ført til to endringer i aminosyresekvensen, dvs i posisjon 102 (endring av threonin til isoleucin) og posisjon 106 (prolin til serin). pDPG434-plasmidet inneholder foruten andre gener også *bla*-genet, som koder for ampicillinresistens. *mepsps*-genet sitter på et 3,49 kilobase(kb) stort *NotI*-restriksjonsenzymfragment. Fragmentet inneholder følgende elementer: en risaktinpromoter og -intron (*r-act P+I*), et optimalisert kloroplast overføringspeptid (OTP) med genelementer fra mais og solsikke, og en nopalinsyntase 3'-

ende terminatorsekvens (NOS3') fra *Agrobacterium tumefaciens*. Ampicillinresistensgenet sitter utenfor *NotI*-restriksjonsenzymfragmentet.

NotI-fragmentet ble klippet ut av plasmidet med *NotI*-restriksjonsenzym og overført til suspensjonskulturer med embryonale maisceller ved hjelp av partikkelakselerasjonsmetoden. *NotI*-fragmentet inneholder ikke antibiotikaresistensgen. Transformanter ble selektert ved at de overlevde og vokste i nærvær av glyfosat.

Karakterisering av geninnsettingen

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

Det er her kun beskrevet en fullstendig mEPSPS kassetten inneholder følgende gener og DNA-elementer (se figur 2):

mepsps- ekspresjonskassetten

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



Figur 2. Rekombinant *mepsps* DNA fragment i maisens genom.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Syngenta viser til at konsentrasjonen av mEPSPS-protein i GA21 er målt i prøver fra feltforsøk i Illinois, USA i 2004 og Spania i 2007. Detaljer av disse analysene betraktes av Syngenta som konfidensiell informasjon.

Forsøket i USA inkluderte to transgene GA21-hybrider (115TT-189, 47TT-593) og deres respektive umodifiserte, nær-isogene linjer. Uttrykket av mEPSPS-protein ble målt ved hjelp av enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) i blad, røtter, frø, pollen og hel planter på fire ulike vekststadier. Det ble detektert mEPSPS-protein i de aller fleste undersøkte plantevev. I gjennomsnitt over alle utviklingsstadier varierte konsentrasjonen av mEPSPS-protein i blad, røtter og hel plante mellom deteksjonsgrensen (<0,2 µg/g råvekt) og ca 15 µg/g råvekt (<0,3 til 70 µg/g tørrvekt, t.v.). I frø ble nivået av proteinet målt til 4-7 µg/g råvekt (5-10 µg/g t.v.) ved modning og visning, mens verdiene for pollen var i gjennomsnitt 168 µg/g råvekt. Uttrykt i form av biomasse i felt varierte mengden av mEPSPS-protein mellom ca 108 g mEPSPS/haa 6 uker etter utplanting til 537 g mEPSPS/haa ved blomstring. Nivået av det endogene EPSPS-proteinet var signifikant lavere sammenlignet med konsentrasjonen av modifisert mEPSPS-protein i GA21.

Forsøket i Spania inkluderte en transgen hybridlinje (H8124GT), samt en umodifisert, nær-isogen kontroll. Det ble detektert mEPSPS-protein i alt plantevev som ble undersøkt. I gjennomsnitt varierte konsentrasjonene av proteinet mellom 5,9 og 18,9 µg/g råvekt i blad og 2,1-5,5 µg/g råvekt i røtter. Videre ble nivået av mEPSPS-protein målt til henholdsvis 5,6 til 10,2 µg/g råvekt i prøver av hel plante og 5,9-6,8 µg/g råvekt i frø. Konsentrasjonen av proteinet i pollen varierte mellom 99,8 og 101,6 µg/g råvekt.

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

EFSA's GMO-panel ba om ytterligere informasjon vedrørende potensielle nye åpne leserammer inni ekspressjonskassen, mellom og inni det rekombinante DNA-fragment på 18,5 kb som er satt inn i planten. Syngenta påviste en ny åpen leseramme. Det ble konkludert med at denne åpne leserammen ikke hadde de nødvendige DNA-komponenter for transkribering. Dersom den skulle bli transkribert vil den ikke resultere i polypeptid som kunne resultere i potensielle toksiske eller allergene konsekvenser.

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

I henhold til dokumentasjonen fra Syngenta er genetisk stabilitet undersøkt ved analyse av genomisk DNA fra tre tilbakekryssingsgenerasjoner (BC1, BC2 og BC3). Resultatene av Southern blot-analysene viser at det rekombinante DNA-innskuddet er stabilt integrert i maisgenomet og nedarves stabilt over generasjoner. Videre er fenotypisk stabilitet demonstrert ved spaltingsdata fra tre tilbakekryssingsgenerasjoner. Frø fra disse generasjonene ble dyrket i veksthus, og bladprøver analysert for konsentrasjon av mEPSPS-protein. Analysene viser stabilt uttrykk av mEPSPS-proteinet over generasjoner.

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

Delkonklusjon

Faggruppen har tidligere vurdert karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i GA21, og de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av proteinet til å være tilfredsstillende (VKM 2005a, 2009).

2.2.3. Hybriden MIR604 x GA21

Molekylær karakterisering

MIR604 x GA21 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom maislinjene MIR604 og GA21. Molekylærbiologiske analyser viser at de rekombinante fragmentene i planten inneholder de samme gener og genelementer som er i foreldrelinjene MIR614 og GA21. Både *mepsps*-, *mcry3A*-, og *pmi*-genene som uttrykkes i maiskorn er undersøkt med Southern-blot analyse. Flankerende sekvenser til de rekombinante DNA-fragmentene i MIR604 x GA21 er ikke sekvensert. Siden MIR604 x GA21 er fremkommet ved konvensjonell kryssing mellom MIR604 og GA21 hevder Syngenta at sekvensene i og rundt de respektive fragmentene er uendret. Syngenta henviser til dokumentasjonen for MIR604 og GA21 for analyser av åpne leserammer.

Analyser dokumentert i søknad for GA21 av enzymatisk aktivitet av mEPSPS-proteinet viser ingen forskjell mellom plante- og bakterieprodusert protein. Fordøyelighetstest viste også at mEPSPS-proteinet fordøyes raskt i simulert mage- og tarmsaft. Fordøyelighetstest dokumentert i søknadene for MIR604 viser at mCry3A-proteinet fordøyes raskt i simulert magesaft. mCry3A-proteinet består av en proteaseresistent og en proteasefordøyelig del. I insektarmen vil den proteasefordøyelige delen spaltes til aminosyrer, mens den resistente delen ikke blir fordøyd. I simulert tarmsaft fra mennesker fordøyes fullengde proteinene raskt. Den proteaseresistente delen av proteinene er etter 24 timer spaltet i minst 3 biter. Detaljer av de komparativ Southern-blot analyse av Bt11, MIR604 og Bt11 x MIR604 (vedlegg 1) betraktes av Syngenta som konfidensiell informasjon.

Informasjon vedr. uttrykk av introduserte gener

Søker opplyser om at uttrykk av proteinene mCry3A og mEPSPS ble målt i veksthus i USA i 2005. Forsøket ble utført i form av en blokk med to rekker. Det ble plantet MIR604, GA21, MIR604 x GA21 og en umodifisert linje NP2672/NP2171. GA21 ble krysset inn i linje NP2171 og MIR604 inn i linje NP2672. For analyser ble det tatt ut fem planter fra transgene plantene og to planter fra umodifisert. Det ble foretatt analyser av prøver blad, røtter, pollen og korn på til sammen 3 ulike utviklingsstadier og 3 gjentak. I følge dokumentasjon fra søker var nivåene av målte proteinprodukter i vegetativt vev og korn i overensstemmelse med variasjonsområdene for de respektive foreldrelinjene. Nivået av mCry3A, PMI og mEPSPS for henholdsvis blad, røtter, og korn i moden plante er gjengitt her. Mengde mCry3A i pollen ble målt ved blomstring. Uttrykk av mCry3A blad, røtter og korn ble målt til henholdsvis $35,1 \pm 4,4$ µg/g tørrvekt (TV) (variasjonsbredde (VB)=28,5-38,6), $17,6 \pm 2,5$ µg/g TV (VB=15,3-21,1), $0,45 \pm 0,13$ µg/g TV (VB=0,37-0,52), PMI til $2,7 \pm 0,7$ µg/g TV (VB=2,0-3,8), $2,8 \pm 0,9$ µg/g TV (VB=2,3-3,2) og $1,5 \pm 0,3$ µg/g TV (VB= 1,2-1,7), og mengde mEPSPS til $11,9 \pm 2,4$ µg/g TV (VB= 10,3-14,2), $6,1 \pm 1,4$ TV (VB= 5,3-6,6) og $2,7 \pm 0,3$ TV (VB=2,4-3,0).

Nivået av mCry3A, PMI og mEPSPS i pollen var lavere enn kvantifiseringsgrensen på 0,02 µg/g tørrvekt, (VB=22,4-33,7) og (82,6-97,7).

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

Søker viser til spaltingsdata fra kryssinger over flere generasjoner med foreldrelinjene MIR604 og GA21 og resultater fra en kryssingsgenerasjon med hybridene for å demonstrere genetisk stabilitet. Videre viser Southern analyser av de rekombinante innskuddene i MIR604 x GA21-genomet at det er molekylær ekvivalens og identisk kopitall med de rekombinante DNA- innskuddene i foreldrelinjene.

Delkonklusjon

Hybriden MIR604 x GA21 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom maislinjene MIR604 og GA21. Spaltingsdata og Southern-analyser indikerer at de innsatte strukturene nedarves stabilt, og at antall, struktur og organisering av disse genkonstruksjonene er ekvivalent med de som finnes i foreldrelinjene. Nivåene av mCry3A-, PMI og mEPSPS-proteiner i vegetativt vev og korn er sammenlignbare med uttrykk av tilsvarende proteinprodukter i foreldrelinjene.

3. Komparative analyser

3.1. Valg av komparator og forsøksdesign

I følge dokumentasjon fra Syngenta er det ikke foretatt analyser av maishybriden MIR604 x GA21 med hensyn på ernæringsmessige komponenter, sekundære metabolitter eller antinæringskomponenter. Søker viser til at foreldrelinjene og konvensjonelle nær-isogene linjer er sammenlignet i en rekke feltforsøk over flere vekstsesonger. GA21 er testet i feltforsøk i Argentina og USA siden 2001, mens MIR604 har vært testet i felt i Argentina og USA siden 2001. Videre har Syngenta utført feltforsøk med trippelhybriden Bt11 x MIR604 x GA21 i USA i 2006 (EFSA/GMO/UK/2008/56). I følge Syngenta er bruk av trippelhybriden som testlinje for komparative analyser av ernæringsmessige karakterer i henhold til EFSA's retningslinjer for risikovurdering av hybrider med 'stablede egenskaper': "*As long as each event in the highest number of stacked events has been risk assessed, the risk assessment of the stacked events might also be applicable to GM stacks containing fewer of these events*" (EFSA 2007). Dette forutsetter imidlertid at hybridene med høyest antall transgener er risikovurdert. Søknad EFSA/GMO/UK/2008/56 ble fremmet på et seinere tidspunkt, og fullstendig dokumentasjonen knyttet til søknaden var ikke publisert på EFSA-nett og ikke tilgjengelig for faggruppen i forbindelse med risikovurdering av hybridene Bt11 x GA21.

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 Bt11 x MIR604 x GA21

Hovedkomponenter i maiskorn og andre plantedeler

Valg av analyseparametre er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002). Det er foretatt forskjellige analyser av hovedkomponenter i fôrfraksjon og korn. Syngenta gir summarisk oversikt over hvilke analyser som er foretatt og statistiske signifikante forskjeller. For nærmere informasjon henvises det til konfidensiell informasjon i vedlegget appendix 4.

I prøver av førfraksjon ble det analysert for innhold av aske, fett, protein, vann, ADF (acid detergent fibre), NDF (neutral detergent fibre), fosfor, kalsium. Det er ikke påvist signifikante forskjeller for disse komponentene.

I korn ble det analysert for følgende parametre: protein, fett, aske, vann, karbohydrater, ADF, NDF, total fiber (TDF), aminosyrer, fettsyrer (C8-C22), fosfor, jern, kalium, kalsium, kobber, magnesium, mangan, natrium, sink, vitaminene B1, B2, B6, E, folinsyre og niacin, de sekundære metabolittene furfural, ferulsyre og p-kumarinsyre, og anti-næringsstoffene trypsinhemmer, inositol, fytinsyre og raffinose.

Av de 56 analyserte parametrene ble det påvist statistisk signifikante forskjeller for TDF, fett, vitamin E (α -tokoferol) og linolsyre. På bakgrunn av disse dataene konkluderer Syngenta med at Bt11 x MIR604 x GA21 og alle hybrider med færre antall transgener er lik konvensjonell mais mht ernæringsmessige komponenter.

Fettsyresammensetning i maiskorn

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

Aminosyrer i maiskorn

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

Vitaminer

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

Mineraler

Innholdet av mineraler er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Innholdet av natrium var lavere enn påvisningsgrensen både i umodifisert og modifisert mais. Forskjellen er 23 % og verdiene er innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen. For sink er det funnet statistisk signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll, mens det er påvist signifikant genotype x sted-samspill for kalsium. Det er ikke funnet signifikante forskjeller for andre analyserte mineraler. De statistiske forskjellene som er påvist er lavere enn 20 %, og alle verdiene ligger innenfor typiske verdier som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2006).

Sekundære metabolitter og antiernæringskomponenter

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

3.3. Agronomiske egenskaper

Søker opplyser at det er gjennomført feltforsøk med maislinjen MIR604 x GA21 på fem lokaliteter i USA i 2005. Hvert forsøksfelt bestod av et fullstendig randomisert blokkdesign med tre gjentak. Femten kommersielt tilgjengelige hybridsorter ble benyttet som referansmateriale i forsøkene. I tillegg ble det benyttet en ikke-transgen maislinje med tilsvarende genetisk bakgrunn som kontroll (LH198 × LH172). Det er foretatt registreringer av en rekke agronomiske og morfologiske karakterer knyttet til reproduksjon, spredning, vegetativ vekst, sjukdoms- og insektsresistens, samt toleranse mot ulike abiotiske stressfaktorer (tørke, vind, næringsmangel etc.). Det er foretatt statistiske analyser innen steder og kombinerte analyser over steder for hver karakter. De kombinerte analysene viser signifikante forskjeller ($p \leq 0,05$) mellom MIR604 x GA21 og kontrollinjen for karakterene legde, frøavling, samt tidlighet målt som antall dager til dannelse av silke. Gjennomsnittsverdiene for disse parametrene ligger imidlertid innenfor variasjonsområdene for referansesortene og 99 % toleranseintervall som er presentert i søknaden. For de øvrige karakterene ble det ikke funnet signifikante forskjeller

Variansanalyser innen steder viser signifikante forskjeller ($p \leq 0,05$) for karakterene 'antall dager til silking', lengde, tørrstoffinnhold og avling på enkelte av lokalitetene. Søker konkluderer med at observerte verdier av fenotypiske og agronomiske karakterer ligger innenfor forventet variasjonsområde for mais. Syngenta viser også til at feltforsøk med foreldrelinjene MIR604 og GA21 på en rekke lokaliteter i USA og Argentina ikke har avdekket signifikante forskjeller i forhold til kontrollsorter med hensyn på agronomiske karakterer.

3.4. Delkonklusjon

Syngenta har ikke foretatt analyser av maishybriden MIR604 x GA21 med hensyn på ernæringsmessige komponenter, sekundære metabolitter eller antinæringskomponenter, men viser til forsøk med foreldrelinjene MIR604 og GA21, samt trippelhybriden Bt11xMIR604 x GA21.

Analysene av ernæringsmessige viktige komponenter i Bt11xMIR604 x GA21 viser statistiske forskjeller i enkeltparametere. Verdiene for de enkelte analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen. På bakgrunn av disse dataene konkluderer Syngenta med at Bt11 x MIR604 x GA21 og alle hybrider med færre antall transgener er lik konvensjonell mais mht ernæringsmessige komponenter.

Analyser av agronomiske karakterer viser, med unntak av herbicidtoleranse og insektsresistens, ingen signifikante forskjeller mellom MIR604 x GA21 og kontrollinjer

4. Dokumentasjon av toksisitet og allergenitet

4.1. Toksisitet

Når det gjelder toksisitetsstudier med mEPSPS-, PMI- og Cry-proteinet henviser Syngenta til studier som er dokumentert i andre søknader.

Føringsforsøk på broiler

Søknaden inneholder dokumentasjon fra 43-dagers føringsforsøk på broilere. 540 dyr, 90 av hvert kjønn, ble fordelt på seks grupper og føret med henholdsvis mais fra MIR604 x GA21, en umodifisert kontrollhybrid og en kommersielle umodifiserte referansesort. Studien er presentert i Appendix 05. Innhold av mCry3A, PMI og mEPSPS ble målt i føret. Konsentrasjonen av mCry3A var lavere enn kvantifiseringsgrensen, PMI var fra 0,45 til 0,57 µg/g fôr, mEPSPS var 0,99 til 1,52 µg/g fôr. Det ble

konkludert med at det ikke er påvist vesentlige endringer ved føring med maiskorn fra MIR604 x GA21, kontroll-linje og referansehybriden.

Subkronisk føringsforsøk på rotter

Syngenta har ikke foretatt 13 ukers føringsforsøk med rotter med før fra hybridene MIR604 x GA21.

4.2. Allergenitet

Bt-proteiner

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

Adjuvans (fremming av immunreaksjon mot andre stoffer)

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

Det gjennomsnittlige forbruket av mais i Europa er i følge søker 8,8 g/person/dag, mens for eksempel i Afrika er forbruket 106,2 g/person/dag (GEMS/FOOD 2003). Spesielle målgrupper, som barn, kan ha et langt større inntak av mais enn det beregnede gjennomsnittlige inntaket i Europa. I Frankrike er det rapporterte inntaket for store porsjoner, 97,5 persentil, for barn under 6 år 8,3 g/kg kroppsvekt/dag og for voksne 4,17 g/kg kroppsvekt/dag (FAO/WHO 2003). I henhold til Syngenta kan samlet mengde mCry3A i maiskorn være ca. 0,5 µg/g tørrvekt korn. Teoretiske beregninger fra faggruppen viser at dersom alt maisinntak i Europa kommer fra MIR604 x GA21 vil dette kunne medføre et inntak for voksne på ca 4,5 µg Cry-protein/person/dag. Teoretiske beregninger fra faggruppen viser at for barn som spiser store porsjoner blir inntaket ca. 4 µg Cry-protein/kg kroppsvekt/dag og for voksne ca. 2 µg/kg kroppsvekt/dag. De totale mengdene for henholdsvis barn og voksne blir da 67 µg/barn/dag og 120 µg/person/dag. De mengder Cry1Ac som ga mucosal adjuvanseffekt ved sondeføring av mus var fra 0,1 µg til 100 µg (Vazquez *et al.* 1999).

Et realistisk inntak av Cry-protein vil være vesentlig lavere enn de mengdene som er angitt ovenfor. Mais er en bulkvare hvor flere typer mais fra mange åkrer samles i felles siloer før videre prosessering. Man vil således aldri spise 100 % MIR604 x GA21-mais. Vi spiser stort sett prosessert mais hvor, i mange tilfeller, proteinene er helt eller delvis degradert eller er fjernet. Søker oppgir at mCry3A brytes

raskt ned i magesaft. Eksponering av tarmepitel for mCry3A-protein forventes dermed å være marginal.

De adjuvansdoser som brukes for immunisering av mus og mennesker i andre sammenhenger er ofte av samme størrelsesorden, det vil si at om lag samme dose brukes til mus og menneske. Det er mulig at mCry3A som benyttes i MIR604 x GA21 kan ha tilsvarende effekter som vist for det beslektede Cry1Ac-proteinet, som induserer immunologiske reaksjoner mot seg selv og økt reaksjon mot proteiner gitt samtidig. Dersom mCry3A g har tilsvarende adjuvanseffekt som det beslektede Cry1Ac-proteinet er rapportert å ha, vil dette teoretisk kunne føre til økt utvikling av allergi mot matvarer spist sammen med maisen, foruten mot maisen selv. Matallergi mot mais er lite vanlig i Norge, men et problem i andre områder, bl.a. Nord-Italia. Man ville forvente at adjuvanseffekten kom til syne først og fremst som økt forekomst av allergi mot de matvarene der matallergi fra før er vanligst. IgE ble ikke målt i de refererte studiene av adjuvanseffekt av Cry1Ac-proteinet.

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

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

4.3. Delkonklusjon

Det er ikke utført 13 ukers fôringsforsøk på rotter med verken MIR604 x GA21 eller Bt11 x MIR604 x GA21. I henhold til EFSA's retningslinjer (EFSA 2007) skal det foreligge en vurdering av potensialet for økt toksisitet og/eller allergenisitet. Faggruppen mener at søker ikke tilstrekkelig har vurdert om slikt potensiale foreligger sammenlignet med umodifisert mais.

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

Et mindretall av faggruppen (A.H. Nerland, T. Bøhn, A.I. Myhr, C. Linnestad, H. Klungland) finner det vanskelig å vurdere om næringsmidler og fôrvarer fra mais MIR604 x GA21 er mer allergifremkallende enn næringsmidler og fôrvarer fra umodifiserte maiskorn. På bakgrunn av foreliggende eksperimentelle studier i mus, som viser at Cry-proteiner kan hemme den toleransen som fordøyelsessystemets slimhinner har mot proteiner, finner imidlertid disse medlemmene at muligheten for økt allergifremkallende aktivitet hos MIR604 x GA21 med den informasjon vi har tilgang til, ikke

med rimelig sikkerhet kan utelukkes. Mindretallet mener at det kan ikke utelukkes at slike effekter kan oppstå ved inntak av maisprodukter som inneholder aktivt mCry3A-protein, d.v.s. om mCry3A kan føre til økt allergiutvikling mot andre komponenter i mat som spises samtidig. Adjuvanseffekter er tidligere ikke trukket inn i risikovurdering av mat, men på bakgrunn av økt fokus på matallergi er denne problemstillingen aktualisert.

En samlet faggruppe finner at mat- og fôrprodukter fra Bt11 x MIR604, som ikke inneholder Cry-proteiner, eksempelvis oljebaserte produkter, ikke medfører endret risiko for helse i forhold til annen mais.

5. Miljørisikovurdering

Maishybriden MIR604 x GA21 er dannet ved konvensjonelle krysninger mellom to innavlede linjer, avledet av maislinjene MIR604 og GA21. Foreldrelinjen MIR604 er transformert med et modifisert *cry3A*-gen (*mcry3A*) fra *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, og uttrykker et mCry3A-protein som gir plantene toleranse mot angrep fra bladbiller i slekten *Diabrotica*, eksempelvis *D. virgifera virgifera* ('Western Corn Rootworm') og *D. longicornis barberi* ('Northern Corn Rootworm'). I tillegg inneholder den innsatte genkonstruksjonen et *pmi*-gen fra *Escherichia coli*. Genet koder for enzymet fosfomannose isomerase (PMI), som omdanner mannose-6-fosfat til fruktose-6-fosfat. Foreldrelinjen GA21 inneholder et modifisert *epsps*-gen (*mepsps*), som uttrykker mEPSPS-enzymet, og som gir toleranse mot herbicider med virkestoff glyfosat.

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

5.1. Potensiale for ikke tilsiktede 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, har ingen frøkvile og 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 og Lid 2005). Til tross for omfattende dyrking av mais over mange år i Europa, er det ikke påvist noen risiko knyttet til spredning, etablering og invasjon av naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder. Det er ingen stedeegne eller introduserte viltvoksende arter i den europeiske flora som mais kan hybridisere med (OECD 2003).

Spredning av mais til andre habitater i Europa er hovedsakelig begrenset av dårlig konkurransevne, manglende frøkvile, mottagelighet for sjukdom og liten toleranse for lave temperaturer. Det er ikke påvist forskjeller mellom den insektresistente maislinjen og konvensjonelle sorter med tilsvarende

genetisk bakgrunn for disse karakterene, og det er det ikke grunn til å anta at den introduserte egenskapen hos MIR604 x GA21 vil medføre økt fitness utenfor dyrkingsmiljø i forhold til konvensjonelle maissorter.

5.2. Potensiale for genoverføring

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

Siden mais ikke har viltvoksende populasjoner eller nærstående arter utenfor dyrking i Europa, vil vertikal genoverføring være knyttet til krysspollinering med konvensjonelle og eventuelle økologiske sorter.

5.2.1. Horisontal genoverføring

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

Ut fra dagens vitenskapelig innsikt med hensyn til barrierer for genoverføring mellom ubeslektede arter og flere års forskning for om mulig å framprovosere tilfeldig overføring av genetisk materiale fra planter til mikroorganismer er det lite som tyder på at transgenene i MIR604 x GA21 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. Forutsetningen for at dette kunne skje var sekvenshomologi mellom plantetransgenet og mottagerbakterien. I hvilken grad det forekommer tilfeldig sekvenshomologi mellom plantetransgener og naturlig forekommende bakterier er usikkert, men siden de fleste transgenene inneholder rekombinerte DNA sekvenser fra jordbakterier kan dette ikke utelukkes (Bensasson *et al.* 2004).

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

5.2.2. Vertikal genoverføring

Potensialet for krysspollinering mellom MIR604 x GA21 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.

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

5.3. Potensiale for samspill mellom GMP og målorganismer

Foreldrelinjen MIR604 er transformert med et modifisert *cry3A*-gen (*mcry3A*) fra *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, og uttrykker et mCry3A-protein som gir plantene toleranse mot angrep fra bladbiller i slekten *Diabrotica*, eksempelvis *D. virgifera virgifera* ('Western Corn Rootworm') og *D. longicornis barberi* ('Northern Corn Rootworm'). I tillegg inneholder den innsatte genkonstruksjonen et *pmi*-gen fra *Escherichia coli*. Genet koder for enzymet fosfomannose isomerase (PMI), som omdanner mannose-6-fosfat til fruktose-6-fosfat. *D. virgifera virgifera* er det eneste målinsektet som er påvist i Europa (Crop Protection Compendium 2007). Det har ikke vært rapportert om funn av *D. virgifera virgifera* i Norge (<http://www.faunaeur.org/distribution.php>).

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

5.4. Potensiale for samspill mellom GMP og ikke-målorganismer

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

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

5.5. Potensiale for samspill med abiotisk miljø og eventuelle effekter på biogeokjemiske prosesser

Ved foreskrevet bruk av maislinjen MIR604 x GA21 vil eksponeringsnivået av Cry-proteiner være svært lavt, og ikke medføre signifikante effekter på abiotisk miljø og biokjemiske prosesser.

5.6. Delkonklusjon

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

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

6. Vurdering av søkers dokumentasjon

1) Søkers dokumentasjon vurderes som ikke tilstrekkelig til å foreta en risikovurdering innenfor områdene som omfattes av internasjonale retningslinjer. I følge Syngenta er det ikke foretatt analyser av maishybriden MIR604 x GA21 med hensyn på ernæringsmessige komponenter, sekundære metabolitter eller antinæringskomponenter. Søker viser til at foreldrelinjene og konvensjonelle nær-isogene linjer er sammenlignet i en rekke feltforsøk over flere vekstsesonger. Videre har Syngenta utført feltforsøk med trippelhybriden Bt11 x MIR604 x GA21 i USA en vekstsesong (EFSA/GMO/UK/2008/56). I følge Syngenta er bruk av trippelhybriden som testlinje for komparative analyser av ernæringsmessige karakterer i henhold til EFSA's retningslinjer for risikovurdering av hybrider med 'stablede egenskaper': *“As long as each event in the highest number of stacked events has been risk assessed, the risk assessment of the stacked events might also be applicable to GM stacks containing fewer of these events”* (EFSA 2007). Dette forutsetter imidlertid at hybridene med høyest antall transgener er risikovurdert. Søknad EFSA/GMO/UK/2008/56 ble fremmet på et seinere tidspunkt, og fullstendig dokumentasjonen knyttet til søknaden var ikke publisert på EFSA-nett og ikke tilgjengelig for faggruppen i forbindelse med risikovurdering av hybridene MIR604 x GA21.

2) Adjuvans er ikke en del av internasjonale retningslinjer for risikovurdering av mattrygghet. Forskningsfeltet på adjuvans i mat er generelt lite eller ubetydelig. Adjuvanseffekt er tidligere ikke trukket inn i risikovurdering av mat, men på bakgrunn av det økte fokus på matallergi som problem og den påviste sterke adjuvanseffekten av mCry3A på antistoffproduksjon i dyremodeller, er denne problemstillingen aktualisert.

3) Faggruppen finner det problematisk at søker har definert svært mye av dokumentasjonen som konfidensiell informasjon. Det er ulik praksis mellom de ulike selskapene hvilke opplysninger som unndras offentlighet, og faggruppen etterlyser kriterier for hva søker kan definere som konfidensiell informasjon.

KONKLUSJON

Syngenta har ikke foretatt analyser av hybridene MIR604 x GA21 med hensyn på ernæringsmessige komponenter, sekundære metabolitter eller antinæringskomponenter, men henviser til undersøkelser av trippelhybriden Bt11 x MIR604 x GA21 (EFSA/GMO/UK/2008/56). I følge EFSA's retningslinjer for risikovurdering av hybrider med 'stablede egenskaper' (EFSA 2007) er dette tilfredsstillende så lenge hybridene med høyest antall transgener er risikovurdert. Søknad EFSA/GMO/UK/2008/56 ble imidlertid fremmet på et seinere tidspunkt, og fullstendig dokumentasjon knyttet til Bt11xMIR604xGA21 var ikke tilgjengelig i forbindelse med risikovurdering av hybridene MIR604 x GA21.

Det er ikke utført 13 ukers fôringsforsøk med hybridene MIR604 x GA21 eller Bt11 x MIR604 x GA21. Faggruppen konkluderer derfor med at søker ikke i tilstrekkelig grad har vurdert om det foreligger potensiale for økt toksisitet sammenlignet med umodifisert mais.

Flere studier viser at proteinene mEPSPS og PMI ikke er akutt toksiske. Faggruppen konkluderer med at det er lite sannsynlig at eksponering for proteinene i seg selv og i de mengder som tilføres via genmodifisert mais, er helsemessig betenkelig.

Ingen av proteinene mCry3A og mEPSPS har likheter med kjente allergener eller egenskaper som tilsier at de er allergener. Det er imidlertid ikke vurdert om det uttrykte toksinet mCry3A kan ha adjuvanseffekter, d.v.s. fremming av immunreaksjon mot andre stoffer

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

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

En samlet faggruppe finner at mat- og fôrprodukter fra MIR604 x GA21, som ikke inneholder Cry-proteiner, eksempelvis oljebaserte produkter, ikke medfører endret risiko for helse i forhold til annen mais.

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

Samlet vurdering

Faggruppe for genmodifiserte organismer finner det ikke godtgjort at bruk av maislinjen Bt11 x GA21 ikke vil medføre endret risiko for helse i forhold til annen mais. Faggruppen påpeker også at det er kunnskapshull knyttet til om Cry-proteinet i MIR604 x GA21 kan virke som adjuvant.

Faggruppen finner det lite trolig at den omsøkte bruken av MIR604 x GA21 vil medføre endret risiko for miljø i forhold til annen mais.

REFERANSER

- de Vries J & Wackernagel W (2002) Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(4):2094-2099.
- EFSA (2004) Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. *The EFSA Journal* 48: 1-18. http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_opinions/384.html
- EFSA (2006) 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 (2007) Guidance Document for the risk assessment of genetically modified plants containing stacked transformation events. *The EFSA Journal* 512: 1-5.
- EHC (1999) Environmental Health Criteria 217. *Bacillus thuringiensis*. WHO, Geneva 1999.
- EPA (2003) Event MON863 *Bt* Cry3Bb1 Corn Biopesticide Registration Action Document.
- Guerrero GG, Russell WM, Moreno-Fierros L (2007) Analysis of the cellular immune response induced by *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins in mice: Effect of the hydrophobic motif from diphtheria toxin. *Mol Immun* 44:1209–1217.
- Hallauer AR (2000) Potential for outcrossing and weediness of genetically modified insect protected corn. APHIS-USDA.
- Lid J & Lid DT (2005) Norsk flora. Det Norske Samlaget, Oslo. 7. utgave. 1230 s.
- Meadow R (2007) Expected effects and side effects of approval for the use of maize MON 810 on target and non-target arthropods in and around maize fields in Norway. Rapport fra Bioforsk Plantehelse. 9 s.
- Moreno-Fierros L, Ruiz-Medina EJ, Esquivel R, López-Revilla R, Piña-Cruz S (2003) Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides in mice. *Scand J Immunol*. 57: 45-55.
- Netherwood T, Martín-Orúe SM, O'Donnell AG, Gockling S, Graham J, Mathers JC & Gilbert HJ (2004) Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nat Biotechnol* 22(2):204-209.
- Nielsen KM, van Elsas JD & Smalla K (2000) Transformation of *Acinetobacter* sp. 13(pFG4delta*nptII*) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Appl Environ Microbiol* 66: 1237-42.
- Nielsen KM (2003) An assessment of factors affecting the likelihood of horizontal transfer of recombinant plant DNA to bacterial recipients in the soil and rhizosphere. *Collection of Biosafety Reviews (Italy)*, Vol. 1. pp. 96-149.
- 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.
- Prasad SSSV & Shethna YI (1975) Enhancement of immune response by the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 62: 517-521.
- Rojas-Hernández S, Rodríguez-Monroy MA, López-Revilla R, Reséndiz-Albor AA & Moreno-Fierros L (2004) Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infect Immun.*, 72:4368-4375.
- Schubbert GW, Lettmann C & Doerfler W (1994) Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice *Mol Gen Genet* 242:495-504.
- 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.
- Vazquez-Padron RI, Martinez-Gil AF, Ayra-Pardo C, Gonzalez-Cabrera J, Prieto-Samsonov DL, de la Riva GA (1998) Biochemical characterization of the third domain from *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. *Biochem Mol Biol Int.*, 45(5):1011-20.
- Vazquez RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazan L, De La Riva GA, Lopez-Revilla R (1999) *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand J Immunol.*, 49: 578-84.
- Vazquez-Padron RI, Gonzales-Cabrera J, Garcia-Tovar C, Neri-Bazan L, Lopez-Revilla R, Hernandez M, Moreno-Fierro L, de la Riva GA (2000a) Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. *kurstaki* HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. *Biochem Biophys Res Commun.*, 271:54-8.
- Vazquez-Padron RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazan L, Martinez-Gil AF, de-la-Riva GA, Lopez-Revilla R (2000b) Characterization of the mucosal and systemic immune response induced by Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice. *Braz J Med Biol Res.*, 33:147-55.
- VKM (2005a) *Uttalelse om Monsantos genmodifiserte mais GA21 (C/ES/98/01)*. 05/305-endelig. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.
http://www.vkm.no/eway/default.aspx?pid=0&oid=-2&trg=_new&_new=-2:16947
- VKM (2005b) *Uttalelse om Syngentas genmodifiserte mais MIR604 (EFSA/GMO/UK/2005/11)*. 05/323-endelig. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.
http://www.vkm.no/eway/default.aspx?pid=0&oid=-2&trg=_new&_new=-2:16917
- VKM (2005c). *Report from an Ad Hoc Group appointed by the Norwegian Scientific Panel on Genetically Modified Organisms and Panel on Biological Hazards – An assessment on potentially long-term health effects caused by antibiotic resistance marker genes in genetically modified organisms based on antibiotic usage and resistance patterns in Norway*. Opinion 05/302-1-final. Norwegian Scientific Committee for Food Safety, Oslo, Norge. 62 p.

VKM (2009). *Helse- og miljørisikovurdering av genmodifisert maislinje GA21 fra Syngenta Seeds S.A.S. (EFSA/GMO/UK/2008/60). Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer.* Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge. Utkast.