



**Helse- og miljørisikovurdering
genmodifisert maishybrid Bt11 x MIR604
fra Syngenta Seeds Inc.
(EFSA/GMO/UK/2007/50)**

**Uttalelse fra
Faggruppe for genmodifiserte organismer
Vitenskapskomiteen for mattrygghet
3.04.09**

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,

Koordinatorer fra sekretariatet:

Arne Mikalsen, Merethe Aasmo Finne

SAMMENDRAG

Helse- og miljørisikovurderingen av den herbicid- og insektsresistente maishybriden Bt11 x MIR604 fra Syngenta (EFSA/GMO/UK/2007/50) er utført av Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet. Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning (DN) ber Vitenskapskomiteen for mattrygghet om å vurdere den genmodifiserte maislinjen Bt11 x MIR604 til import og prosessering, og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Søknaden gjelder ikke 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. Bt11 x MIR604 er risikovurdert i henhold til tiltenkt bruk i EU/EØS-området, og faggruppen har derfor ikke vurdert mulige helse- og miljøeffekter knyttet til dyrking av maislinjen. Vurderingen er i overensstemmelse med miljø- og helsekravene i genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven, samt EU-forordning 1829/2003/EF og utsetningsdirektiv 2001/18/EF med annekser. Det presiseres at de deler av den norske konsekvensutredningsforskriften som vedrører bærekraft, samfunnsnytte og etikk ikke er vurdert av VKM. Videre er 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 utilsiktede effekter på fitness, genoverføring og effekter på ikke-målorganismer vurdert.

Maishybriden Bt11 x MIR604 er resultat av konvensjonell kryssing mellom foreldrelinjene Bt11 og MIR604. Foreldrelinjene Bt11 og MIR604 er tidligere vurdert av Faggruppe for genmodifiserte organismer (FG3) i Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM 2005b; 2007).

Foreldrelinjen Bt11 har fått innsatt de bakterielle genene *cry1Ab* og *pat*, fra henholdsvis *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* og *Streptomyces viridochromogenes* strain Tu494. *Cry1Ab*-genet koder for et δ -endotoksin, som gir plantene toleranse mot enkelte arter i ordenen *Lepidoptera*. *Pat*-genet koder for enzymet phosphinothricin acetyl transferase (PAT), som acetylerer og inaktiverer glufosinat-ammonium, virkestoffet i fosfinotricin-herbicerider av typen Finale. Fosfinotricin er et ikke-selektivt kontaktherbicerid 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. Bt11-plantene vil derfor tolerere høyere doser av sprøytemiddelet glufosinat ammonium sammenlignet med konkurrerende ugras.

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.

Syngenta har ikke foretatt analyser av hybrid Bt11 x MIR604 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 hybrid Bt11 x MIR604 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 Bt11xMIR604.

Det er ikke utført 13 ukers fôringsforsøk med hybridene Bt11 x MIR604, Bt11 x MIR604 x GA21 eller foreldrelinjen Bt11. 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 PAT 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 Cry1Ab, mCry3A, PAT og PMI har likheter med kjente allergener eller egenskaper som tilsier at de er allergener. Det er imidlertid ikke vurdert om det uttrykte toksinet Cry1Ab og 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 Cry1Ab og mCry3A har egenskaper som fører til hemming av den toleransen som fordøyelsessystemets slimhinner har mot proteiner (adjuvanseffekt). På bakgrunn av at Cry1Ab- og mCry3A-proteinene brytes ned i magesaft og at maten for øvrig inneholder en lang rekke stoffer som virker som adjuvanter, vurderes adjuvansproblemstillingen i forbindelse med Bt11 x MIR604 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 Bt11 x MIR604 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 Bt11 x MIR604 ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes.

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.

Søknaden gjelder godkjenning av maislinjen Bt11 x MIR604 for import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige helse- og 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 Bt11 x MIR604 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 MIR604 ikke vil medføre endret risiko for helse i forhold til annen mais. Faggruppen påpeker også at det er kunnskapshull knyttet til om Cry-proteinene i Bt11 x MIR604 kan virke som adjuvant.

Faggruppen finner det lite trolig at den omsøkte bruken av Bt11 x MIR604 vil medføre endret risiko for miljø i forhold til annen mais.

NØKKEWORD

Mais, *Zea mays* L., genmodifisert mais, Bt11 x MIR604, insektsresistens, herbicidtoleranse, *cry1Ab*, *pat*, *mcry3A*, *pmi*, Cry1Ab-toksin, mCry3A-toksin, PAT-protein, glufosinat ammonium, PMI-protein, helsemessig trygghet, helse, adjuvans, miljø, forordning 1829/2003/EF, direktiv 2001/18/EF

FORKORTELSER OG ORDFORKLARINGER

ADF	Acid detergent fiber, fiberfraksjon av ufordøyelig plantemateriale i fôr, vanligvis cellulosefiber dekket med lignin og silikat. Plantematerialet fordøyes med en syre-detergentløsning (ADF). Ufordøyd masse betegnes som ADF. Fôr med lavt ADF-innhold er mer fordøyelig og har større energiinnhold.
Allel	Et bestemt gen kan foreligge i ulike varianter (alleler). Allelene kan være dominante (bestemmende for fenotypen) eller recessive (vikende).
ARMG	Antibiotikaresistensmarkørgen
Backcross (BC)	Tilbakekryssing. Kryssing mellom en hybridlinje (avkom fra to genetisk ulike foreldre) og en av foreldrelinjene, alternativt en genetisk ekvivalent organisme. Strategi i planteforedling for å overføre primært kvalitative karakterer, for eksempel sjukdomsresistens, til elitelinjer av både kryssbefruktede og selvpollinerte arter. Gjentatte tilbakekryssinger reduserer det genetiske bidraget, som uønskede alleler fra den andre donorplanten.
	BC ₁ , BC ₂ etc: betegnelse på 1. og 2. tilbakekryssingsgenerasjon, etc.
BLASTn	Algoritme som benyttes for homologisammenligning av nukleotidsekvenser
BLASTP	Algoritme som benyttes for homologisammenligning av aminosyresekvenser i proteiner
BLASTx	Algoritme som benyttes for oversetting fra kodende nukleotidsekvenser til aminosyresekvenser
bp	Basepar
<i>B.t.</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Codex	FAO/WHO-organ som etablerer globale handelsstandarder for mat
Cry	Krystallproteiner fra jordbakterien <i>Bacillus thuringiensis</i>
Cry1Ab	δ-endotoksin isolert fra jordbakterien <i>Bacillus thuringiensis</i> subspecies <i>kurstaki</i> , som gir plantene resistens mot angrep fra arter i ordenen <i>Lepidoptera</i> .
Cry3	En klasse av <i>B.t.</i> -krystallproteiner med effekt mot arter i ordenen <i>Coleoptera</i> (biller).
Dominant allel	Et allel som uttrykker same fenotype, uavhengig av om allelene i genparet er like (homozygot) eller ulike (heterozygot).
DN	Direktoratet for naturforvaltning
DNA	Deoxyribonukleinsyre (DNA)
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMBL	European Molecular Biology Laboratory, det europeiske forskningssenteret for molekylærbiologi
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.
Glufosinat ammonium	Bredspektret herbicid
GMO	Genmodifisert organisme
GMP	Genmodifisert plante
Herbicid	Ugrasmiddel
Intron	Ikke-kodende områder i et eukaryot gen.
Locus	Spesifikk posisjon på kromosomet der et gen er lokalisert.
MALDITOF	Massespektrometrimetode for å måle molekylvekt til peptider.
Mannose	Et monosakkarid, dvs. består av et enkelt suktermolekyl.
<i>mcry3A</i>	Modifisert <i>cry3A</i> -gen fra <i>Bacillus thuringiensis</i> subspecies <i>tenebrionis</i> .
mCry3A	δ-endotoksin, som gir plantene resistens mot angrep fra bladbiller i slekten <i>Diabrotica</i> .

Mendelsk nedarving	Lovmessig nedarvingsmønster ved ulike typer kryssinger.
MT	Mattilsynet
NDF	Neutral detergent fiber, dvs. fiberfraksjon som inneholder hemicellulose og ADF.
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.
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)
PAT	Phosphinothricin Acetyl-transferase protein, acetylerer og inaktiverer glufosinat
PCR	Polymerase chain reaction. Polymerase kjedereaksjon. Metode for å lage mange kopier av en DNA-sekvens vha primere.
PDB	Protein Data Bank, database som inneholder eksperimentelt bestemte 3-dimensjonale strukturer av proteiner og nukleotider.
Promoter	En molekylærbiologisk promoter inneholder DNA-sekvenser som binder enzymet RNA polymerase. RNA polymerase fører til syntese av mRNA fra DNA, dvs. omskriving(transkribering) av DNA til mRNA.
Rekombinant DNA	-Kombinasjon av DNA sekvenser som normalt ikke opptrer sammen, dvs. DNA-fragmenter(gen, promoter, terminator etc.) fra flere forskjellige kilder (f.eks. bakterier, planter) som skjøtes sammen.
RNA	Rribonukleinsyre
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 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.
Terminator	En molekylærbiologisk terminator er en DNA-sekvens som fører til at RNA-polymerasen stopper opp, og avslutter transkripsjonen.
U.S. EPA	United States Environmental Protection Agency, USAs miljøvernmyndigheter.
Utviklingsstadier hos mais:	
	<u>Vegetative stadier</u>
	VE: oppspiring
	V1: 1. blad
	V2: 2. blad
	V(n): n'te blad
	VT: synlige hannblomsterstand (tassel)
	<u>Reproduktive stadier</u>
	R1: synlige hunnblomster
	R2: 'blister'
	R3: melkmodning
	R4: deigmodning
	R5: dent
	R6: fysiologisk moden
Vektor	En molekylærbiologisk vektor (kloningsvektor) er et kunstig fremstilt DNA-molekyl som benyttes for å overføre genetisk materiale til en celle. De fire hovedtypene av vektorer er plasmider, bakteriofager og andre virus, kosmider og kunstige kromosomer.
Western-blot	Metode for overføring av proteiner til en membran.

INNHOLDSFORTEGNELSE

BIDRAGSYTERE.....	2
Vurdert av	2
SAMMENDRAG	3
NØKKEWORD	5
FORKORTELSER OG ORDFORKLARINGER.....	6
INNHOLDSFORTEGNELSE	8
BAKGRUNN	9
OPPDRAG FRA DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING OG MATTILSYNET	9
RISIKOVURDERING	11
1. Innledning	11
1.1. Beskrivelse av egenskaper(er) og virkningsmekanismer.....	11
2. Molekylær karakterisering	12
2.1. Hybridproduksjon.....	12
2.2. Evaluering av foreldrelinjer	12
2.3. Hybriden Bt11 x MIR604.....	17
3. Komparative analyser	18
3.1. Valg av komparator og forsøksdesign	18
3.2. Analyser av ernæringsmessige komponenter i Bt11 x MIR604 x GA21	18
3.3. Agronomiske egenskaper.....	19
3.4. Delkonklusjon.....	20
4. Dokumentasjon av toksisitet og allergenisitet.....	20
4.1. Toksisitet	20
4.2. Allergenisitet	20
4.3. Delkonklusjon.....	22
5. Miljørisikovurdering.....	22
5.1. Potensiale for utilsiktede effekter på fitness relatert til genmodifiseringen.....	23
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	25
5.4. Potensiale for samspill med abiotisk miljø og eventuelle effekter på biogeokjemiske prosesser	25
5.5. Delkonklusjon.....	25
6. Vurdering av søkers dokumentasjon.....	25
KONKLUSJON.....	27
REFERANSER.....	29

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 Bt11 x MIR604 fra Syngenta Seeds Inc. (EFSA/GMO/UK/2007/50). 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 11. mars 2008, med frist på 90-dager for innspill fra EU- og EØS/EFTA-landene.

Foreldrelinjen Bt11 er godkjent som fôrmais under direktiv 90/220/EF, og som søtmais under forordning (EF) nr. 258/97. Linjen er videre notifisert som eksisterende produkt under forordning 1829/2003/EF, artikkel 8 og 20, til bruk som mat, fôr, samt tilsetningsstoffer til mat og fôr. Godkjenningen av Bt11 gikk ut i april 2007, og Syngenta har søkt om fornyet godkjenning fram til 2017. Maislinjen Bt11 er også søkt godkjent for dyrking i EU/EØS-området. I Norge ble Bt11 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).

Foreldrelinjen MIR604 er søkt godkjent til import, prosessering, mat, fôr, samt tilsetningsstoffer til mat og fôr.

Norge har ikke tidligere uttalt seg om maishybriden. Begge foreldrelinjene er tidligere vurdert av Faggruppe for genmodifiserte organismer med hensyn på eventuelle helseeffekter ved bruk av maislinjene som mat og fôr (VKM 2005b, 2007).

Utenfor EU/EØS-området er maishybriden Bt11 x MIR604 godkjent for omsetning som mat/fôr i Japan og Mexico (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.

Faggruppe for genmodifiserte organismer skal i tråd med oppdragsbrev utarbeide helse- og miljørisikovurdering av maishybriden Bt11 x MIR604 til import og industriell prosessering, samt til bruk som næringsmiddel og fôrvare. Søknaden omfatter ikke dyrking. Vurderingen av maishybriden Bt11 x MIR604 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 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/2007/50 (Bt11 x MIR604).

Unik kode: SYN-BTØ11-1 x SYN-IR6Ø4-5.

Status i EU: Søknad under 1829/2003/EF. EFSAs frist for innspill er 11.06.08.

Ønsket svarfrist til Mattilsynet/DN: 11. juni 2008.

RISIKOVURDERING

1. Innledning

Helse- og miljørisikovurderingen av maishybriden Bt11 x MIR604 er i hovedsak basert på dokumentasjon som er tilgjengelig på EFSAAs nettside GMO EFSAAnet knyttet til søknader om godkjenning av maishybriden Bt11 x MIR604 og foreldrelinjene Bt11 og MIR604 (EFSA/GMO/UK2007/50; EFSA/GMO/RX/Bt11; EFSA/GMO/UK/2005/11). I tillegg er det benyttet uavhengige vitenskapelige publikasjoner med referee i vurderingene.

I henhold til Syngenta er bruksområder for søknaden import og bruk som næringsmidler, fôrvarer og industrielle produkter, ikke for dyrking. Primærbruken av maiskorn i Norge i dag er til dyrefôr, men mais brukes også til industriell produksjon av etanol, maismel, popkorn, raffinert stivelse og søtningsprodukter.

Risikovurderingen er gjort i henhold til tiltenkt bruk, og i overensstemmelse med miljø- og helsekravene i genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven. Videre er kravene i EUs forordning 1829/2003/EF og direktiv 2001/18/EF med annekser lagt til grunn for vurderingen.

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

Faggruppen har vedtatt å benytte EFSAAs retningslinjer som gruppens retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter. Prinsippene som er lagt til grunn for vurderingen, er derfor hentet fra EFSAAs dokument "Guidance document of the scientific panel on genetically 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 Bt11 x MIR604 er dannet ved tradisjonell kryssingsforedling mellom to innavlede linjer, avledet av de genmodifiserte maislinjene Bt11 og MIR604.

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

Foreldrelinjen MIR604 er transformert med et modifisert *cry3A*-gen (*mcry3A*) fra *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, under kontroll av en maispromotor fra et metallothionein-lignende gen (*mtl*). *mCry3A*-genet uttrykker et mCry3A-protein, og gir plantene toleranse mot angrep fra bladbiller i slekten *Diabrotica*, eksempelvis *D. virgifera virgifera* ('Western Corn Rootworm') og *D. longicornis barberi* ('Northern Corn Rootworm'). Proteinene uttrykkes primært i røttene hos maisplantene. I tillegg inneholder den innsatte genkonstruksjonen et *pmi*-gen fra *Escherichia coli*. Genet koder for enzymet fosfomannose isomerase (PMI), som omdanner mannose-6-fosfat til fruktose-6-fosfat. Mannose kan derfor benyttes som karbonkilde hos planter som uttrykker *pmi*-genet, og er i denne sammenheng brukt som seleksjonsmarkør under transformasjonsprosessen. *Pmi*-genet er under kontroll av maispromotoren *ZmUbiIntron*, som uttrykkes konstitutivt i enfrøbladete planter.

2. Molekylær karakterisering

2.1. Hybridproduksjon

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

2.2. Evaluering av foreldrelinjer

2.2.1. Maislinje Bt11

Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

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

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

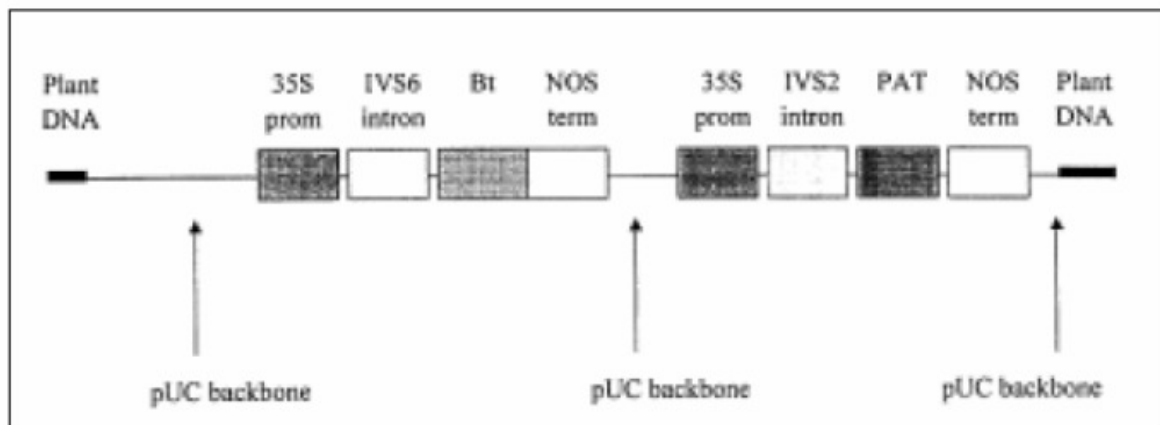
Det er benyttet Southern blot og PCR for å karakterisere det rekombinante DNA-fragmentet i planten. Molekylærbiologisk karakterisering viser at det er satt inn bare en kopi av det rekombinante DNA-fragmentet i maisens genom. Dette fragmentet inneholder følgende gener og DNA-elementer (se figur 1).

CryIAb-ekspresjonskasset

- a) 35S Blomkål mosaikk virus (CaMV) promoter, 514 basepar (bp)
- b) IVS6 Intron fra mais *Adh1-S* gen (alkohol dehydrogenase 1S), 472 bp
- c) *CryIAb* en syntetisk, modifisert versjon av *cryIAb* gen, 1845 bp. Koder for CryIAb proteinet
- d) *NOS-3'* Et 3'-område til nopalinnosin syntetase gen som ikke blir translatert, men som terminerer transkript og som dirigerer polyadenylering, 270 bp

Pat-ekspresjonskasset

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



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

Karakterisering av geninnsettingen

Den genmodifiserte maislinjen Bt11 uttrykker insektsresistens og herbicidtoleranse.

Bakgrunnen for insektsresistens er at planten uttrykker bakterieproteinene Cry1Ab. Basesekvensen til *cryIAb*-genet stammer fra jordbakterien *Bacillus thuringiensis*. Bakgrunnen for glufosinattoleransen er *pat*-genet, som stammer fra jordbakterien *Streptomyces viridochromogenes*. *Pat*-genet uttrykker enzymet fosfinitricin acetyltransferase (PAT, fosfinitricin acetyltransferase), som har høy spesifisitet overfor fosfinitricin (glufosinat), som er den aktive komponenten i herbicider av glufosinat-typen. PAT inaktiverer fosfinitricin ved N-acetylering og beskytter derved planten i et fosfinitricinmiljø. Basesekvensene i genene er endret slik at genene kan uttrykkes i planter. PAT-proteinets aminosyre-sekvens i planten er lik bakterieproteinets aminosyresekvens.

Molekylærbiologiske analyser

Molekylærbiologiske analyser viser at det rekombinante fragmentet i planten inneholder de samme genene og genelementene som er på det tilsvarende T-DNA fragmentet i plasmidet pZO1502. Cry1Ab-

og PAT- proteinene som uttrykkes i maiskorn er undersøkt med Western-blot analyse og densitometri, SDS-PAGE og densitometri, trypsinbehandling av proteinene og peptidkartlegging med SDS-PAGE, CNBR-behandling og Southern blot, amiosyreanalyse av N-enden til proteinet, samt glykosyleringsanalyse.

Cry1Ab-proteinet er undersøkt med hensyn til bioaktivitet. Bioaktivitetsassayene (mortalitet og veksthemming) viser ved forsøk med maispyralide at semidødelig (mortalitet) dose (LD50) for rensset planteproduert Cry1Ab- og *E. coli* produsert Cry1Ab-protein er henholdsvis 0,47 µg Cry1Ab/ml (variasjonsbredde 0,33 til 0,66 µg Cry1Ab/ml) og 0,50 µg Cry1Ab/ml (variasjonsbredde 0,38 til 0,66 µg Cry1Ab/ml). Proteinene viser veksthemmende aktivitet (EC50) ved en dose på henholdsvis 0,060 µg Cry1Ab/ml (variasjonsbredde 0,046 til 0,076 µg Cry1Ab/ml) og 0,067 µg Cry1Ab/ml (variasjonsbredde 0,042 til 0,107 µg Cry1Ab/ml).

Det ble ikke påvist glykoliserings seter på proteinene.

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

Informasjon vedrørende uttrykk av introduserte gener og åpne leserammer (ORF)

Konsentrasjonen av Cry1Ab- og PAT-protein er målt i ulike plantevev og i hel plante under fire utviklingsstadier. Nivået av Cry1Ab i pollen var lavere enn påvisningsgrensen på 0,15 µg/g tørrvekt. Gjennomsnittlig variasjonsområder for Cry1Ab i blad, røtter og hel plante målt til henholdsvis 12 - 154 µg/g tørrvekt, 9 - 22 µg/g tørrvekt og 6 - 70 µg/g tørrvekt i tre ulike vekststadier. Konsentrasjonen av Cry1Ab i modne maiskorn ble gjennomsnittlig målt til ca. 2 µg/g tørrvekt, mens uttrykket av PAT-protein var lavt, og målbare mengde ble bare påvist i blad, hunn- og hannblomster. I maiskorn, pollen, røtter og stilk var nivået av proteinet under deteksjonsgrensen. I maiskorn var innholdet av PAT-protein lavere enn 0,00016 % av totalt protein.

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

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

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

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

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

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

Delkonklusjon

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

2.2.2. Maislinje MIR604

Beskrivelse av egenskaper, transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

Den genmodifiserte maislinjen MIR604 uttrykker insektsresistens og mannosetoleranse. Bakgrunnen for insektsresistens er at planten uttrykker en variant av 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* genet, 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, promoter MTL fra mais, mais sin *ZmUbiIntron* promoter og mais polyubiquitin genets første intron, *pmi* gen fra *E. coli*, samt 3' ikke-translatert område fra nopalinsyntase (NOS) området fra *Agrobacterium tumefaciens*. NOS avslutter (terminerer) transkripsjonen. DNA-fragmentet inneholder ikke antibiotikaresistensgener.

Karakterisering av geninnsettingen

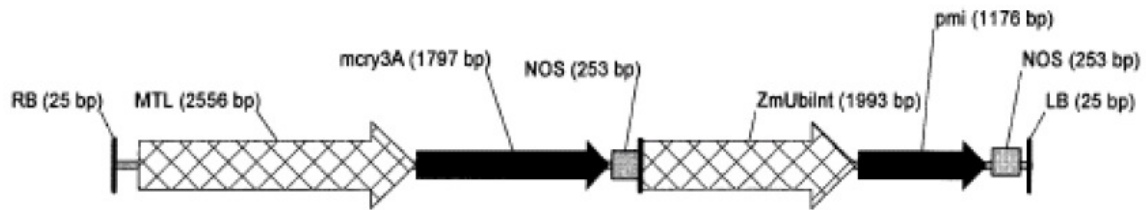
Southern blot-, TaqMan PCR- og sekvensanalyse av DNA isolert fra blad, viser at et nesten fullengde kopi av pZM26 rekombinante DNA-fragment er satt inn i maisens genom. Molekylærbiologisk karakterisering viser at det er satt inn bare en kopi av det rekombinant DNA-fragmentet i maisens genom.

Beskrivelse av de innsatte genene

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

mCry3A ekspresjonskasset

- a) MTL 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* genet 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* genet. Disse endringene medfører to aminosyre-endringer, valin i posisjon 61 er byttet ut med alanin (V61A) og glutamin i posisjon 210 med histidin (Q210H). Den første endringen er en konservativ endring, begge er alifatiske aminosyrer. Den andre endringen er substitusjonen av en syregruppe med en basisk gruppe. Disse endringene har ikke resultert i endringer i enzymets funksjon. Det er ikke påvist vektorsekvenser som ligger utenfor høyre- og venstre grense.

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

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

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

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

Med unntak av pollen, 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.

2.3. Hybriden Bt11 x MIR604

Molekylær karakterisering

Bt11 x MIR604 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom maislinjene Bt11 og MIR604.

Molekylærbiologiske analyser viser at de rekombinante fragmentene i planten inneholder de samme gener og genelementer som er i foreldrelinjene Bt11 og MIR604.

Southern blot av DNA fra Bt11 x MIR604-hybriden viser at de rekombinante DNA fragmentene fra henholdsvis Bt11 og MIR604 er integrert i Bt11 x MIR604. Detaljer av de komparativ Southern-blot analyse av Bt11, MIR604 og Bt11 x MIR604 (vedlegg 1) er også unndratt offentlighet.

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

Informasjon vedr. uttrykk av introduserte gener

Syngenta har klassifisert proteinekspressjonsanalysene som konfidensiell informasjon og unntatt offentlighet. I følge søker er uttrykk av proteinene Cry1Ab, PAT, mCry3A og PMI målt i prøver fra feltforsøk i USA i 2005. Forsøket inkluderte foreldrelinjene Bt11, MIR604 og hybridene Bt11 x MIR604. En ikke-transgen maislinje med tilsvarende genetisk bakgrunn ble brukt som kontroll. Det ble foretatt analyser av prøver fra hele planter, samt prøver av fôr, røtter, pollen og frø på til sammen 7 ulike utviklingsstadier. Analysene ble foretatt ved hjelp av enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). I følge dokumentasjon fra søker var nivåene av målte proteinprodukter i vegetativt vev og frø i overensstemmelse med variasjonsområdene for de respektive foreldrelinjene.

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

Søker viser til spaltingsdata fra kryssinger over tre generasjoner med hybridene for å demonstrere genetisk stabilitet. Videre viser Southern analyser av de rekombinante innskuddene i Bt11 x MIR604-genomet at det er molekylær ekvivalens og identisk kopitall med de rekombinante DNA- innskuddene i foreldrelinjene.

Delkonklusjon

Hybriden Bt11 x MIR604 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom maislinjene Bt11 og MIR604. Spaltingsdata og Southern-analyser indikerer at de innsatte strukturene nedarves stabilt, og at antall,

struktur og organisering av disse genkonstruksjonene er ekvivalent med de som finnes i foreldrelinjene. Nivåene av Cry1Ab-, PAT-, mCry3Ab- og PMI-proteinene i vegetativt vev og frø er sammenlignbare med uttrykk av tilsvarende proteinprodukter i foreldrelinjene.

3. Komparative analyser

3.1. Valg av komparator og forsøksdesign

I følge dokumentasjon fra Syngenta Seeds Inc. er det ikke foretatt analyser av maishybriden Bt11 x MIR604 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. Bt11 ble testet i ni feltforsøk i USA vekstsesongen 2004, 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 på 6 lokaliteter 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 MIR604.

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 i 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 fôrfraksjon 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 antinæringskomponenter

Sekundære metabolitter og antiernæringskomponenter er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Det er ikke funnet signifikante forskjeller for påviste sekundære metabolitter og antinæringskomponenter. Innholdet 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

Syngenta har klassifisert majoriteten av dokumentasjonen knyttet til vurdering av agronomisk ekvivalens som konfidensiell.

I følge søknaden er det foretatt observasjoner av agronomiske karakterer hos maishybriden Bt11 x MIR604 og nær-isogene linjer i en serie feltforsøk på 10 lokaliteter i USA i 2005. Det ble foretatt registreringer av opp til 20 agronomiske og morfologiske karakterer knyttet til reproduksjon, spredning, vegetativ vekst, sjukdoms- og insektsresistens, samt toleranse mot ulike abiotiske stressfaktorer på hver lokalitet. I følge Syngenta ble ikke alle parameterne registrert på alle forsøksstedene. Det er foretatt statistiske analyser innen lokaliteter og kombinerte analyser over lokaliteter for hver karakter. I henhold til søker ble det funnet signifikante forskjeller mellom Bt11 x MIR604 og kontroll for variablene blomstringstid og tørrstoffinnhold på enkelte av forsøksstedene. Søker konkluderer med at observerte verdier av fenotypiske og agronomiske karakterer ligger innenfor

forventet variasjonsområde for mais. Syngenta viser også til at feltforsøk med foreldrelinjene Bt11 og MIR604 på en rekke lokaliteter i USA og Europa ikke har avdekket signifikante forskjeller i forhold til kontrollsorter med hensyn på agronomiske karakterer.

3.4. Delkonklusjon

Syngenta har ikke foretatt analyser av maishybriden Bt11 x MIR604 med hensyn på ernæringsmessige komponenter, sekundære metabolitter eller antinæringskomponenter, men viser til forsøk med foreldrelinjene Bt11 og MIR604, samt trippelhybriden Bt11xMIR604xGA21. Analysene av ernæringsmessige viktige komponenter i Bt11xMIR604xGA21 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 eller små signifikante forskjeller mellom Bt11x MIR604 og kontrollinjer.

4. Dokumentasjon av toksisitet og allergisitet

4.1. Toksisitet

Når det gjelder toksisitetssudier med mEPSPS-, PAT- og Cry-proteinene henviser Syngenta til studier som er dokumentert i andre søknader.

Fôringsforsøk på broiler

Søknaden inneholder dokumentasjon fra 42-dagers fôringsforsøk på broilere, Appendix 5. Informasjon i Appendix 5 blir av Syngenta betraktet som konfidensiell informasjon. Det ble foretatt fôringsstudier på hann- og hunn fugl. Fôringsstudiene viser ingen vesentlige endringer ved fôring med maiskorn fra Bt11 x MIR604, en ikke-transgen mais og en referansehybrid.

Subkronisk fôringsforsøk på rotter

Syngenta har ikke foretatt 13 ukers fôringsforsøk med rotter. Det er heller ikke utført subkronisk fôringsforsøk med foreldrelinjen Bt11.

4.2. Allergisitet

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. Dette til tross for betydelig human oral-, dermal- og inhalasjonseksposering (EHC 1999). Flestparten 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-proteinene binder seg til musetarmoverflaten (Vazquez-Padron *et al.* 2000a) og induserer immunologiske reaksjoner mot seg selv og mot proteiner gitt samtidig (Vazquez *et al.* 1999). Immunologisk kartlegging av systemisk og mucosal immunreaksjon på Cry1Ac har videre påvist at mus lager både systemisk IgM, IgG og sekretorisk IgA etter intraperitoneal og intragastrisk immunisering (Vazquez-Padron *et al.* 2000b). Det er ukjent om Cry1Ac-proteinene som er benyttet i disse studiene, tilsvarer Cry1Ab- og mCry3A-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 Cry1Ab og mCry3A i maiskorn være ca. 2,7 µg/g tørrvekt korn. Teoretiske beregninger fra faggruppen viser at dersom alt maisinntak i Europa kommer fra Bt11 x MIR604 vil dette kunne medføre et inntak for voksne på ca 24 µg Cry-protein/person/dag. Teoretiske beregninger fra faggruppen viser at for barn som spiser store porsjoner blir inntaket ca. 22 µg Cry-protein/kg kroppsvekt/dag og for voksne ca. 11 µg/kg kroppsvekt/dag. De totale mengdene for henholdsvis barn og voksne blir da 330 µg/barn/dag og 660 µg/person/dag. De mengder Cry1Ac som ga mucosal adjuvanseffekt ved sondeføring av mus var fra 0,1 µg til 100 µg (Vazquez *et al.* 1999).

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

De adjuvansdoser som brukes for immunisering av mus og mennesker i andre sammenhenger er ofte av samme størrelsesorden, det vil si at om lag samme dose brukes til mus og menneske. Det er mulig at Cry1Ab og mCry3A som benyttes i Bt11 x MIR604 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 Cry1Ab og 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 Cry1Ab og mCry3A. Det finnes lite litteratur på området omkring betydning av adjuvanter for induksjon av IgE-mediert allergisk respons. Den foreliggende litteratur tyder i flere tilfeller på at betydningen er liten. I en musemodell for allergiutvikling mot lupin ga bruk av koleratoksin (CT) økt immunrespons for andre immunoglobulin klasser, men ingen IgE respons. Forfatterne antyder at IgE respons er mer avhengig av indre egenskaper ved allergenene og ikke CT-adjuvans (Foss *et al.* 2006). I en lignende rottemodell viste CT også kun en begrenset effekt på utvikling av peanøttallergi (de Jonge *et al.* 2007). Peanøttallergi-artikkelen viste også at det var krevende å klare å indusere allergi i rottene. Rotter som gikk på streng diett i 3 generasjoner ga IgE respons, mens rotter som gikk på allergenfri diett i én generasjon ga ikke IgE respons etter indusering. Disse forsøkene indikerer en begrenset betydning av adjuvans for utvikling av IgE mediert allergi. Utvikling av matallergi skyldes et komplekst spill 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 Bt11 x MIR604, Bt11 x MIR604 x GA21 eller foreldrelinjen Bt11. I henhold til EFSAAs 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 Cry1Ab og mCry3A har egenskaper som fører til hemming av den toleransen som fordøyelsessystemets slimhinner har mot proteiner (adjuvanseffekt). På bakgrunn av at Cry1Ab- og mCry3A proteinene brytes ned i magesaft og at maten for øvrig inneholder en lang rekke stoffer som virker som adjuvanter, vurderes adjuvansproblemstillingen i forbindelse med Bt11 x MIR604 mais til å være neglisjerbar.

Et mindretall av faggruppen (A.H. Nerland, T. Bøhn, A.I. Myhr, C. Linnestad, H. Klungland) finner det vanskelig å vurdere om næringsmidler og fôrvarer fra mais Bt11 x MIR604 er mer allergifremkallende enn næringsmidler og fôrvarer fra umodifiserte maiskorn. På bakgrunn av foreliggende eksperimentelle studier i mus, som viser at Cry-proteiner kan hemme den toleransen som fordøyelsessystemets slimhinner har mot proteiner, finner imidlertid disse medlemmene at muligheten for økt allergifremkallende aktivitet hos Bt11 x MIR604 med den informasjon vi har tilgang til, ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes. Mindretallet mener at det kan ikke utelukkes at slike effekter kan oppstå ved inntak av maisprodukter som inneholder aktivt Cry1Ab- og mCry3A-protein, d.v.s. om Cry1Ab og mCry3A 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 Bt11 x MIR604 er dannet ved konvensjonelle krysninger mellom to innavlede linjer, avledet av maislinjene Bt11 og MIR604. Foreldrelinjen Bt11 inneholder de bakterielle genene *cry1Ab* og *pat*. *Cry1Ab* koder for et δ -endotoksiner som gir plantene toleranse mot enkelte arter i ordenen *Lepidoptera*, eksempelvis *Ostrinia nubilalis* (maispyralide) og arter i slekten *Sesamia* (nattflyfamilien, *Noctuidae*). *Pat*-genet koder for enzymet phosphinothricin acetyl transferase (PAT), som acetylerer og inaktiverer glufosinat-ammonium, virkestoffet i fosfotricin-herbicer (Finale mfl). 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.

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

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, 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 & 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 sykdom 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 Bt11 x MIR604 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 2005a).

Ut fra dagens vitenskapelig innsikt med hensyn til barrierer for genoverføring mellom ubeslektede arter og flere års forskning for om mulig å framprovosere tilfeldig overføring av genetisk materiale fra planter til mikroorganismer er det lite som tyder på at transgenene i Bt11 x MIR604 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 Bt11 x MIR604 vil etableres stabilt i genomet til mikroorganismer i miljøet eller i fordøyelseskanalen hos mennesker eller dyr. Ut fra tilgjengelig kunnskap er det ikke grunn til å forvente at det vil skje horisontal genoverføring av DNA-materiale fra Bt11 x MIR604.

5.2.2. Vertikal genoverføring

Potensialet for krysspollinering mellom Bt11 x MIR604 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 soppsjukdommer og liten frosttoleranse. Som for konvensjonelle sorter er det ingenting som tilsier at eventuelle spillplanter vil overleve til neste vekstsesong eller etablere uønskede populasjoner.

5.3. Potensiale for samspill mellom GMP og målorganismer

Foreldrelinjene Bt11 og MIR604 er transformerte med de bakterielle genene *cry1Ab* og *mcry3A*. Cry1Ab-proteinene som uttrykkes i Bt11 gir plantene resistens mot enkelte skadeinsekter i ordenen *Lepidoptera*, nærmere bestemt *Ostrinia nubilalis* (maispyralide) og enkelte arter i slekten *Sesamia*. Det er rapportert om enkeltfunn av maispyralide i Vestfold, Telemark og Agder (<http://nhm.uio.no/norlep/>), men arten er ikke rapportert som skadegjører (Meadow 2007). Det er ikke

gjort observasjoner av *Sesamia*-arter i Norge. MCry3A-proteinet som uttrykkes i MIR604 gir plantene resistens mot angrep fra larver i billeslekten *Diabrotica*, eksempelvis *D. virgifera virgifera* ('Western Corn Rootworm'), *D. barberi* ('Northern Corn Rootworm') og *D. undecimpunctata howardi* ('Southern Corn Rootworm'). *D. virgifera virgifera* er det eneste målinsektet som er påvist i Europa, men det har ikke vært rapportert om funn i Norge (<http://www.faunaeur.org/distribution.php>; Crop Protection Compendium 2007).

Tatt i betraktning tiltenkt bruksområde for maishybriden Bt11 x MIR604, 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 Bt11 x MIR604 med opphav i utilsiktet frøspredning under ulike omsetningsledd antas ikke å medføre risiko for ikke-målorganismer.

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

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

Ved foreskrevet bruk av maislinjen Bt11 x MIR604 vil eksponeringsnivået av Cry-proteiner være svært lavt, og ikke medføre signifikante effekter på abiotisk miljø og biokjemiske prosesser.

5.5. Delkonklusjon

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

Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av maislinjen i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Risiko for utkryssing med dyrkede sorter vurderes til å være ubetydelig. Ved foreskrevet bruk av maislinjen Bt11 x MIR604 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 Bt11 x MIR604 med hensyn på ernæringsmessige komponenter, sekundære metabolitter eller antinæringskomponenter. Søker viser til at foreldrelinjene og konvensjonelle næringsgenetiske 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 EFSAAs retningslinjer for risikovurdering av hybrider med 'stabilede 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 hybriden 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 hybrid Bt11 x MIR604.

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 Cry1Ac 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 Bt11 x MIR604 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 'stabile 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 risikovurderingen av hybridene Bt11xMIR604.

Det er ikke utført 13 ukers fôringsforsøk med hybridene Bt11 x MIR604, Bt11 x eller MIR604 x GA21 eller foreldrelinjen Bt11. 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 PAT 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 Cry1Ab, mCry3A, PAT og PMI har likheter med kjente allergener eller egenskaper som tilsier at de er allergener. Det er imidlertid ikke vurdert om det uttrykte toksinet Cry1Ab og 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 Cry1Ab og mCry3A har egenskaper som fører til hemming av den toleransen som fordøyelsessystemets slimhinner har mot proteiner (adjuvanseffekt). På bakgrunn av at Cry1Ab- og mCry3A proteinet brytes ned i magesaft og at maten for øvrig inneholder en lang rekke stoffer som virker som adjuvanter, vurderes adjuvansproblemstillingen i forbindelse med Bt11 x MIR604 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 Bt11 x MIR604 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 Bt11 x MIR604 ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes.

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.

Søknaden gjelder godkjenning av maislinjen Bt11 x MIR604 for import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige helse- og 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 Bt11 x MIR604 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 MIR604 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 Bt11 x MIR604 kan virke som adjuvant.

Faggruppen finner det lite trolig at den omsøkte bruken av Bt11x MIR604 vil medføre endret risiko for miljø i forhold til annen mais.

REFERANSER

- Agbios (2009). Agbios GM Database. Information on GM Approved Products.
<http://www.agbios.com/dbase.php>
- Bensasson, D., Boore, J.L. & Nielsen, K.M. (2004). Genes without frontiers. *Heredity*, **92**, 483-489.
- Berin, M.C. & Schreffler, W.G. (2008). T_H2 adjuvants: Implications for food allergy. *J. Allerg. Clin. Immunol.*, **121**, 1311-1320.
- de Jonge, J. D., Knippels, L.M.J., Ezendam, J., Odink, J. Penninks, A. H. & van Loveren, H. (2007). The importance of dietary control in the development of a peanut allergy model in Brown Norway rats. *Methods*, **41**, 99-111.
- de Vries, J. & Wackernagel, W. (2002). Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **99**, 2094-2099.
- 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 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.
- EHC (1999). Environmental Health Criteria 217. *Bacillus thuringiensis*. WHO, Geneve 1999.
- FAO/WHO (2001). *Evaluation of Allergenicity of Genetically Modified Foods*. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/allergygm.pdf>
- Foss, N., Duranti, M., Magni, C. & Frøkiær, H. (2006). Assessment of Lupin Allergenicity in the Cholera Toxin Model: Induction of IgE Response Depends on the Intrinsic Properties of the Conglutins and Matrix Effects. *Int. Arch. Allergy Immun.*, **141**, 141-150 (DOI: 10.1159/000094716)
- GEMS/FOOD (2003). *GEMS/Food regional diets: regional per capita consumption of raw and semi-processed agricultural commodities / prepared by the Global Environment Monitoring System/Food Contamination Monitoring and Assessment Programme (GEMS/Food)*. Rev. ed. FAO/WHO 2003. ISBN: 92 4 159108 0.
- Hallauer, A.R. (2000). Potential for outcrossing and weediness of genetically modified insect protected corn. APHIS-USDA.
- ILSI (2006). International Life sciences Institute Crop Composition Database Version 3.0. URL: <http://www.cropcomposition.org>

- Lid, J. & Lid, D.T. (2005). Norsk flora. Det Norske Samlaget, Oslo. 7. utgave. ISBN: 82-521-6029-8. 1230 s.
- 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 Plantehelsetse. 9 s.
- Moreno-Fierros, L., Ruiz-Medina, E.J., Esquivel, R., López-Revilla, R., Piña-Cruz, S. (2003). Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides in mice. *Scand. J. Immunol.*, **57**, 45-55.
- Netherwood, T., Martín-Orúe, S.M., O'Donnell, A.G., Gockling, S., Graham, J., Mathers, J.C. & Gilbert, 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(pFG4deltanptII) 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.
- 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, S.S.S.V. & Shethna, Y.I. (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, M.A., López-Revilla, R., Reséndiz-Albor, A.A. & Moreno-Fierros, L. (2004). Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infection and Immunity*, **72**, 4368-4375.
- Schubbert, G.W., Lettmann, C. & Doerfler, W. (1994). Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Molecular & General Genetics*, **242**, 495-504.
- Steinrücken H., C. & Amrhein N. (1984). 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of *Klebsiella pneumoniae* 2. Inhibition by glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine]. *Eur. J. Biochem.*, **143**, 351-357.
- TemaNord (1998). *Safety Assessment of Novel Food Plants: Chemical Analytical Approaches to the Determination of Substantial Equivalence*. TemaNord 1998:591. ISBN 92-893-0263-1.
- van Wijk, F. & Knippels, L. (2007). Initiating mechanisms of food allergy: Oral tolerance versus allergic sensitization *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **61**, 8-20.

- Vazquez-Padron, R.I., Martinez-Gil, A.F., Ayra-Pardo, C., Gonzalez-Cabrera, J., Prieto-Samsonov, D.L., de la Riva, G.A. (1998). Biochemical characterization of the third domain from *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. *Biochemistry & Molecular Biology International*, **45**, 1011-20.
- Vazquez-Padron, R.I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazan, L., De La Riva, G.A., Lopez-Revilla, R. (1999). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scandinavian Journal of Immunology*, **49**, 578-84.
- Vazquez-Padron, R.I., Gonzales-Cabrera, J., Garcia-Tovar, C., Neri-Bazan, L., Lopez-Revilla, R., Hernandez, M., Moreno-Fierro, L., de la Riva, G.A. (2000a). Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. *kurstaki* HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **271**, 54-8.
- Vazquez-Padron, R.I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazan, L., Martinez-Gil, A.F., de-la-Riva, G.A., Lopez-Revilla, R. (2000b). Characterization of the mucosal and systemic immune response induced by Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **33**, 147-55.
- VKM (2005a). *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 (2005b). *Risikovurdering av genmodifisert maislinje MIR604 fra Syngenta Seeds (EFSA/GMO/UK/2005/11). Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer 16.12.05. 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 (2007). *Risikovurdering av genmodifisert åkermais Bt11 (C/UK/94/M3/1). Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer 9.2.2007*. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge. <http://www.vkm.no/eway/default.aspx?pid=0&oid=-2&trg=new&new=-2:17397>