



UTTALELSE OM PIONEER HI-BRED/MYCOGEN SEEDS GEN-MODIFISERTE MAIS 59122xNK603 (EFSA/GMO/UK/2005/20)

Vurdert av Faggruppe for genmodifiserte organismer

DATO: 22.09.07

SAMMENDRAG

Vurderingen av den genmodifiserte herbicidresistente og insektstolerante maishybriden 59122xNK603 fra Pioneer Hi-Bred/Mycogen Seeds er utført av Faggruppe for genmodifiserte organismer under Vitenskapskomiteen for mattrygghet. Mattilsynet (MT) ber Vitenskapskomiteen for mattrygghet om å vurdere den genmodifiserte maishybriden 59122xNK603 til bruk i næringsmidler og fôrvarer.

Hybriden 59122xNK603 er fremkommet ved konvensjonell kryssing mellom den genmodifiserte maisen 59122 og Monsanto's genmodifiserte mais NK603. Det kommersielle navnet til hybridene 59122xNK603 på markedet i USA er HerculexTM RW with Roundup Ready technology. Hensikten med 59122xNK603 er motstandsdyktighet mot enkelte insektsarter og toleranse mot sprøytemidler som inneholder virkemidlene glufosinat eller glyfosat.

Vurdering av den genmodifiserte maisen er basert på den dokumentasjonen som er gjort tilgjengelig på EFSA's nettside GMO EFSA.net. Maisen 59122xNK603 er vurdert i henhold til tiltenkt bruk og de prinsipper som er lagt til grunn i EFSA's retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter (EFSA 99, 2004) og Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) konsensusdokument for mais (OECD 2002). Den vitenskapelige vurderingen omfatter transformeringsprosessen, bruk av vektor og det transgene konstruktet, komparativ analyse av ernæringsmessig kvalitet, mineraler, kritiske toksiner, antinæringsstoffer, allergener og nye proteiner.

Analysene av ernæringsmessige viktige komponenter ble vurdert. Det ble bemerket at noen av de komponenter som OECDs konsensusdokument (OECD 2002) anbefaler analysert for mais, ikke er utført. Det er funnet statistiske forskjeller for enkelte komponenter. De statistiske forskjellene for disse komponentene er ikke konsistente da forskjellene som er påvist i enkelte forsøksfelt, ikke er påvist i de andre forsøksfeltene. Faggruppen anser analysene for å være tilstrekkelige for en vurdering av linje 59122xNK603 til bruk som mat og fôr.

Maishybriden inneholder ikke antibiotikaresistensgener.

Informasjon vedrørende allergenisitet viser at for de parametre som er målt, har ikke de uttrykte proteinene likheter med kjente allergener eller egenskaper som tilsier at de er

allergener. Det er imidlertid ikke vurdert om det uttrykte toksinene Cry34Ab1 og Cry35Ab1 kan ha adjuvanseffekter, det vil si øke utviklingen av allergisk respons mot andre proteiner.

Faggruppen finner det vanskelig å vurdere om næringsmidler og fôrvarer fra maisen 59122xNK603 er mer allergifremkallende enn næringsmidler og fôrvarer fra umodifisert maiskorn. På bakgrunn av foreliggende eksperimentelle studier i mus, finner Faggruppen imidlertid at muligheten for økt allergifremkallende aktivitet hos næringsmidler og fôrvarer fra 59122xNK603 i forhold til umodifisert mais med den informasjon vi har tilgang til, ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes. Faggruppen mener at siden adjuvanseffekt av Cry34Ab1 og Cry35Ab1 ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes må det kreves av Pioneer Hi-Bred å kommentere forsøkene som viser adjuvanseffekt av Cry1Ac i forhold til muligheten for adjuvanseffekt av Cry34Ab1 og Cry35Ab1.

NØKKELORD

Genmodifisert mais, 59122xNK603, EFSA/GMO/UK/2005/20, insektsresistens, herbicidtoleranse, PAT, CP4 EPSPS, Cry34Ab1, Cry35Ab1, glufosinat, glyfosat, helsemessig trygghet, helse.

BAKGRUNN

Faggruppe for genmodifiserte organismer under Vitenskapskomiteen for mattrygghet er blitt bedt av Mattilsynet om en vitenskapelig risikovurdering av genmodifisert maishybrid 59122xNK603 (EFSA/GMO/UK/2005/20) til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Vurdering av den genmodifiserte maisen er basert på den dokumentasjonen som er gjort tilgjengelig på EFSAAs nettside GMO EFSAAnet. Mais 59122xNK603 er vurdert i henhold til tiltenkt bruk og de prinsipper som er lagt til grunn i EFSAAs dokument "Guidance document of the scientific panel of genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed" (EFSA 99, 2006). Ved vurdering av vesentlig likhet har Faggruppen lagt vekt på OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002) og dens anbefaling av hvilke parametre som bør undersøkes.

I henhold til Vitenskapskomiteen for mattrygghets uttalelse på møtet 23. april 2004 har Faggruppe for genmodifiserte organismer vedtatt at i de sakene hvor EFSA har kommet med sine uttalelser før Faggruppe for genmodifiserte organismer får sakene til behandling, skal søknadene behandles på samme måte som i EU-landene. Det vil imidlertid bli tatt hensyn til særnorske forhold der slike kan påvises.

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

OPPDRAK FRA MATTILSYNET

I sitt brev ber Mattilsynet Vitenskapskomiteen for mattrygghet om å vurdere den genmodifiserte maisen. Bruksområdet som søknaden gjelder for er import, prosessering, næringsmidler og fôrvarer i henhold til EUs Forordning (EC) nr. 1829/2003, artiklene 3(1)(c), 15(1)(c) og direktiv 2001/18/EØF. Søknaden gjelder ikke for kultivering, og krever derfor ikke vurdering for miljørisiko i henhold til Direktiv 2001/18/EØF. Mattilsynet ber VKM om vurdering av helseaspekter ved disse produktene, og legge risikovurderingen inn på EFSAAnet, og sende kopi av vurderingen til Mattilsynet.

Produktet som ønskes vurdert er:

Genmodifisert mais, EFSA/GMO/UK/2005/20 (59122xNK603). Unik kode er DAS-59122-7x MON-ØØ6Ø3-6.

Status i EU: Søknad under 1829/2003/EF. EFSAAs frist for innspill er 22.09.07.

RISIKOVURDERING

Innledning

Den genmodifiserte maishybriden 59122xNK603 ble vurdert ut fra Mattilsynets oppdrag. I henhold til Pioneer Hi-Bred er søknaden kun for import og bruk som næringsmidler, fôrvarer og industrielle produkter, ikke for utsetting. 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.

Faggruppe for genmodifiserte organismer har på faggruppemøtet 02.02.05 vedtatt å bruke 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 modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed" (EFSA 99, 2006).

Faggruppe for genmodifiserte organismer vurderer søknaden om markedsføring av genmodifisert mais (EFSA/GMO/UK/2005/20) til bruk i næringsmidler og fôrvarer under forordning 1829/2003.

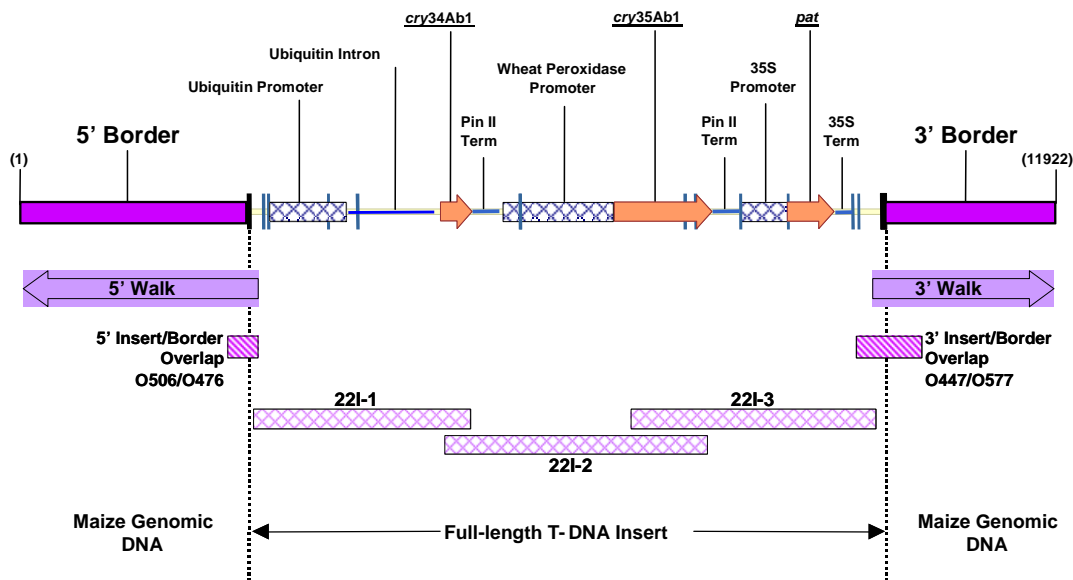
Bakgrunnsinformasjon

Foreldrelinje 59122:

Den genmodifiserte maislinjen 59122 uttrykker glufosinat- og insektstoleranse ved at et lineært DNA fragment på 7390 basepar fra den binære vektoren PHP17662, ble overført til embryomaisceller med *Agrobacterium*-mediert transformasjon. DNA-fragmentet inneholder ikke antibiotikaresistensgen. Dette DNA fragmentet inneholder følgende gener og DNA elementer (se figur):

- a) *ubi1ZM* promoter fra mais, omfatter 5'UTR og intron
- b) *cry34Ab1* gen fra *Bacillus thuringiensis* strain PS149B1. Genet er optimalisert for uttrykk i mais.
- c) *pinII* terminator, kommer fra potet proteinase inhibitor II gen.
- d) *ta* promoter fra hvete peroksidasegenet.
- e) *cry35Ab1* gen fra *Bacillus thuringiensis* strain PS149B1. Genet er optimalisert for uttrykk i mais.
- f) *pinII* terminator, kommer fra potet proteinase inhibitor II gen.
- g) *Pat* gen fra jordbakterien *Streptomyces viridochromogenes*. *pat* gen uttrykker enzymet fosfinotricin acetyltransferase (PAT, phosphinothricin acetyl transferase) som har høy spesifisitet overfor fosfinotricin, som er den aktive komponenten i herbicider av glufosinat-typen. PAT inaktiverer fosfinotricin ved N-acetylering og beskytter derved planten i et fosfinotricinmiljø. Basesequensene i genet er endret slik at genet kan uttrykkes i planter. PAT proteinets aminosyre-sekvens i planten er lik bakterieproteinets aminosyresekvens.
- h) CaMV 35S: Promoteren CaMV 35S og terminatoren CaMV 35S kommer fra blomkål mosaikkvirus. Promoteren styrer uttrykket av *pat*. Termineringen av uttrykket styres av 35S Term.

Figur: T-DNA rekombinant fragmentet fra det binære PHP17662 plasmidet med genomiske flankesekvenser.



Figur 1: Figuren viser et genomisk DNA fragment på 11922 bp hvor T-DNA rekombinat fragment sitter.

PCR-fragmentene 22I-1, 22I-2 og 22I-3 er T-DNA-fragmenter som er sekvensert. 5'Walk og 3'walk er sekvenserte genomiske områder på henholdsvis 2593 bp og 1986 bp.

Karakterisering av geninnsettingen

Southern blot- og sekvensanalyse viser at et nesten fullengde kopi av PHP17662 rekombinante DNA-fragment (7343 bp fra 7390 bp fragmentet) er satt inn i maisens genom. Det er kuttet bort 22 bp fra 5'- og 25 bp fra 3'-delen av DNA fragmentet. Et 11922 bp genomisk DNA-fragment fra mais DAS-59122-7 hvor det rekombinante DNA fragmentet ligger på, er sekvensert. Dette DNA-fragmentet inneholder alle genene (*pat*, *cry34Ab1* og *cry35Ab1*) og de respektive regulatoriske sekvensene. Det er også funnet to base-endringer i fragmentets ikke-kodende område. Ingen av disse endringene påvirker fragmentets åpne leseramme. Det er sekvensert 2593 bp og 1986 bp henholdsvis fra 5'- og 3'-flankesekvenser. Det er funnet små områder med sekvenslikheter med f.eks. kromosomale sekvenser og forskjellige ESTer. Det største området er på 179 bp. Ingen av flankeområdene har likheter med kodende sekvenser for kjente proteiner.

Western blot og påvisning med polyklonale antistoffer viser at både Cry34Ab1, Cry35Ab1 og PAT proteinene har de forventede molekylvektene. Cry35Ab1 forelå som dublett i Western-blott, størrelse 44 kD og 40kD. Tilsvarende bånd ble påvist med bakterie-Cry35Ab1 protein. Årsaken oppgis å være at planteproteaser spalter av et C-terminalt fragment. Det er ingen indikasjoner på fusjonsproteiner. Cry34Ab1 og Cry35Ab1 ble påvist i blad, pollen, korn, stilk og hel plante. PAT ble påvist i blad, rot og stilk.

Påvisning av åpne leserammer (ORF)

Det er gjort studier for å påvise kodende sekvenser. Det er ikke påvist åpne leserammer som fører til uttrykk av peptider som er større enn 100 aminosyrer.

Den genmodifiserte maisen ble krysset med den innavlede linjen PH098B for å danne F1 generasjonen. F1 er selvpollinert 2 ganger, T1S1 og T1S2 generasjon. F1 ble krysset med og tilbakekrysset for å danne BC1 generasjon. Flere forskjellige kryssninger har dannet fire forskjellige 59122 generasjonene T1S1, T1S2, BC1 og BC2S1. Disse fire generasjonene ble undersøkt med Southern blot analyse. Analysene viser at det rekombinante DNA fragmentet er stabilt over fire generasjoner.

Det er også vist at de innsatte genene er stabilt inkorporert i maisgenomet ved dyrking i forskjellige lokaliteter over to år. Feltforsøkene er fra 3 forskjellige land, og over minst 2 år.

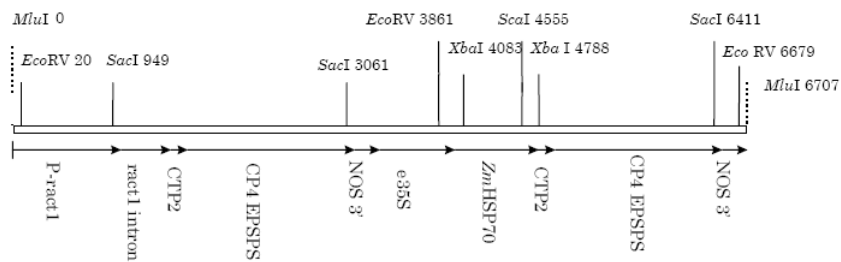
Delkonklusjon

Faggruppen har tidligere vurdert karakteriseringen av det rekombinante innskuddet, de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av 59122 til å være tilstrekkelige.

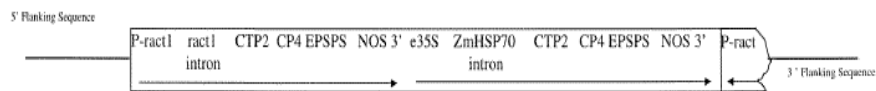
Foreldrelinje NK603:

Den genmodifiserte maislinjen NK603 uttrykker glyfosattoleranse pga. bakterieenzymet 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfatsyntetase, som uttrykkes av *cp4-epsps*-genet. *cp4-epsps*-genet stammer fra jordbakterien *Agrobacterium tumefaciens*. Enzymet omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfat, som er en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. Alle planter og mikroorganismer inneholder dette enzymet, noe som dyr ikke gjør. De må dermed få aromatiske aminosyrer fra føden. *Cp4-epsps*-genet fra bakterien *Agrobacterium* stamme CP4 ble klonet inn i plasmidet PV-ZMGT32. Det rekombinante DNA-fragmentet som ble satt inn i maisgenomet er på 6706 basepar. DNA-fragmentet inneholder to ekspresjonskassetter med et enkelt *cp4-epsps*-gen i hver kassett. Den første kassetten inneholder en aktinpromoter (*P-ract1*) og et intron (*ract1*) fra ris, et optimalisert kloroplast overføringspeptid (*ctp2*), og en nopalinsyntase 3'-ende terminatorsekvens (*NOS3'*). Den andre ekspresjonskassetten inneholder en *e35s*-promoter, et *ZmHSP70*-intron fra mais, *cp4-epsps*-genet og en nopalinsyntase 3'-ende terminatorsekvens (*NOS3'*) (figur 1). DNA-fragmentet ble overført til embryomaisceller med partikkelaksellerasjonsmetoden. DNA-fragmentet inneholder ikke antibiotika-resistensgen. Transformanter ble selektert ved at de overlevde og vokste i nærvær av glyfosat. Southern blot og PCR har blitt brukt for å karakterisere det rekombinante DNA-fragmentet i planten. Den molekylærbiologiske karakteriseringen viser at det er satt inn ett rekombinant DNA-fragment i NK603 åkermais. Ved innsetting i maisgenomet er DNA-fragmentet blitt endret og det inneholder (figur 2):

- a) en fullstendig *cp4-epsps*-kassett som består av fullengde *P-ract1/ract1* intron, *ctp2*, *cp4-epsps* og *NOS3'* kassett
- b) en forkortet *cp4-epsps*-kassett som består av fullengde *e35s*, *ZmHSP70*, *ctp2*, og 2 bp-avkortet *cp4-epsps*-gen, der en av nukleotidendringene er en stille mutasjon, og den andre fører til en aminosyreendring i posisjon 214, fra leucin til prolin. Proteinene som dannes kalles CP4 EPSPS L214P
- c) et invertert fragment (*P-ract*) på 217 baser fra promoter området til *P-ract1* er satt inn etter *NOS 3'* terminatoren i 3'-enden av fragmentet. De ekstra basene omfatter en polylinkersekvens, og de første 167 bp av risaktinpromoter (se figur 2). Dette innskuddet har ingen promoteraktivitet.



Figur 2: Rekombinant DNA-fragment fra plasmidet PV-ZMGT32.



Figur3: Gensekvenser i rekombinante DNA fragmentet etter innsetting i maisgenomet.

Molekylærbiologiske analyser viser at det rekombinante fragmentet i planten inneholder de samme gener og genelementer som er på det tilsvarende fragmentet i bakterien. Genene på det rekombinante DNA-fragmentet i NK603 åkermais uttrykker EPSPS-protein som er identisk (med unntak av én aminosyre) med proteinet som uttrykkes i bakterien. Flankerende sekvenser (se figur 2) til det rekombinante DNA-fragmentet i NK603-planten er sekvensert, et 500 bp PCR-fragment fra 5' flankerende sekvens og et 1183 bp PCR-fragment fra 3' flankerende sekvens. 3'-primeren til 500 bp PCR-fragmentet og 5'-primeren til 1183 bp PCR-fragmentet er lokalisert henholdsvis i *P-ract1*-sekvensen og 3'-ende *NOS3'*-sekvens. Sammenlignende sekvensanalyser med foreldrelinjen LH82xB73 viser at 305 bp av fragmentet fra 3'-enden og 802 bp av fragmentet fra 5'-enden er lik sekvensene til foreldrelinjen.

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

Strukturell og funksjonell likhet mellom CP4 EPSPS og CP4 EPSPS L214P er undersøkt med røntgenkristallanalyse, variabel løkkestruktur i proteinet som inneholder det nye prolinet, og domenet som inneholder det nye prolinet. Disse analysene viser at CP4 EPSPS L214P-proteinene er strukturelt lik CP4 EPSPS proteinet. Analyse av enzymatisk aktivitet viser ingen forskjell mellom de to proteinene. Fordøyelighetstest viste også at begge proteinene fordøyes like raskt i simulert mage- og tarmsaft.

Delkonklusjon

Faggruppen har tidligere vurdert karakteriseringen av det rekombinante innskuddet, samt de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av NK603 til å være tilstrekkelige.

Maishybriden 59122xNK603

Maishybriden 59122xNK603 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom maisene 59122 og NK603.

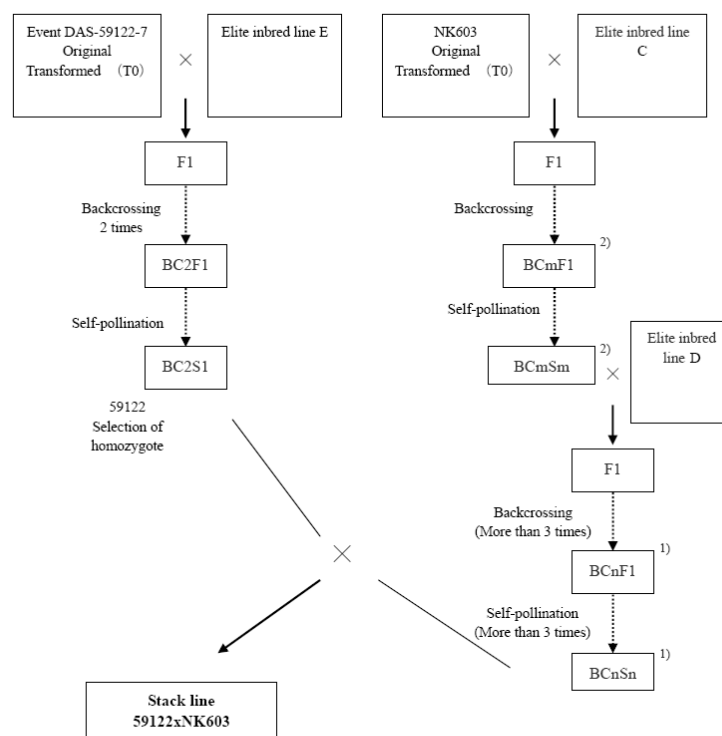


Figure 3 Outline of the process of rearing the stack line 59122xNK603

- 1) The parameter n means $n \geq 3$, indicating that backcrossing (BC) or self-pollination (S) has been carried out more than 3 times.
- 2) BCmSm, provided from Monsanto Company (USA) to Pioneer Hi-Bred International, Inc (USA), is a variety crossed based on the breeding program of Monsanto Company (USA). The suffix "m" in BCmF1 and BCmSm refers to the number of times of backcrossing or self-pollination.

Figur 4: Figuren viser hvilke kryssinger frem til hybriden 59122xNK603.

I henhold til Pioneer er den umodifiserte maisen som den genmodifiserte hybrid blir sammenlignet med, en hybrid som er utviklet på samme måte som den genmodifiserte maisen. Med unntak av de innsatte genene har den umodifiserte maisen den samme genetisk bakgrunn som den genmodifiserte maisen.

Molekylær karakterisering:

Det er foretatt Southern blot-analyse for å undersøke tilstedeværelsen og antall kopier av 59122- og NK603-ekspresjonskassetene i 59122xNK603. DNA som ble brukt til analysene er ekstrahert fra blad. Det er benyttet genprober som er spesifikke for de enkelte genelementene på de respektive rekombinante DNA innskuddene. Det er påvist én enkel kopi av henholdsvis 59122- og NK603-ekspresjonskassetene.

Pioneer hevder at analyser av de rekombinante DNA innskuddene i 59122xNK603 genomet med Southern blot viser at det er molekylær ekvivalens og identisk kopiantall med

rekombinante DNA innskuddene i henholdsvis 59122 og NK603. Sekvensering av DNA oppstrøms og nedstrøms for innsetningsstedet i 59122xNK603 er ikke utført fordi dette er utført i 59122 og NK603. Pioneer hevder også at det ikke er påvist med fusjonsproteiner i 59122xNK603 med Southern blot.

Pioneer hevder at sammenlignende Southern blot-analyser mellom hybridene 59122xNK603 og de to foreldrelinjene viser at bruttostørrelsen på de innsatte DNA-fragmentene er intakte. Det kan derfor ikke forventes endringer i ekspresjonen fra disse elementene.

Analysen av mengde PAT-, CP4 EPSPS-, Cry34Ab1- og Cry35Ab1-proteiner:

Det foretatt analyser av mengde PAT, CP4 EPSPS, Cry34Ab1 og Cry35AB1 i maiskorn. Analysene er foretatt på planter som har vært sprøytet med glufosinat, glyfosat og glufosinat + glyfosat, men ikke på usprøytet planter.

Delkonklusjon

Faggruppen har vurdert de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av proteinene og finner at informasjonen er tilstrekkelig. Faggruppen konkluderer at karakteriseringen av de rekombinante innskuddene i 59122xNK603 er tilfredsstillende.

Dokumentasjon av ”vesentlig likhet”

Analyse av ernæringsmessige viktige komponenter ble foretatt av 59122xNK603 og kontrollhybrid fra fem forskjellige forsøksfelt i USA og ett i Canada for 2003. Hvert forsøksfelt bestod av et fullstendig randomisert blokkdesign som inneholder fire blokker. Hver blokk inneholdt testhybriden 59122xNK603 og kontroll. I blokkene i forsøksfeltene i USA og Canada ble testhybriden sprøytet 2 ganger med enten glufosinat, eller glyfosat eller en gang med glyfosat etterfulgt av en sprøyting med glufosinat. Som kontroll er det benyttet en umodifisert kontrollhybrid som hevdes å ha samme genetisk bakgrunn som de genmodifiserte plantene.

Hovedkomponenter i maiskorn og andre plantedeler:

Valget av analyseparametre er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for mais, men det er ikke analysert for alle parametrene som er anbefalt i OECD dokumentet (OECD 2002). Det ble analysert for protein, fett, aske, karbohydrater, ADF (acid detergent fibre), NDF (neutral detergent fibre), total fiber, kalorier, aminosyrer, fettsyrer, fosfor, jern, kalium, kalsium, kobber, magnesium, mangan, natrium, sink, vitaminene beta-karoten, B1, B2, E, folinsyre, de sekundære metabolittene furfural, ferulsyre, inositol, raffinose og p-cumarinsyre, og anti-næringsstoffene fytinsyre og trypsinhemmer. Det er ikke analysert for vann, selen, niacin og vitamin B6. Analysene ble utført under god laboratoriepraksis (GLP). Det er foretatt analyser av planter som er behandlet enten med glyfosat, glufosinat og glyfosat/glufosinat. Det er tatt ut tre prøver fra hver lokalitet.

For hovedkomponentene er det funnet statistiske forskjeller for protein, ask og karbohydrater, men signifikante forskjeller ble funnet i et eller flere av de seks forsøksfelt. Innenfor forsøksfeltene var tilsvarende forskjeller ikke konsekvente. Analyser over hovedkomponenter

i maisplanten viser at verdier for alle disse hovedkomponentene ligger innenfor typiske verdiområder for andre maissorter som er publisert.

Fettsyresammensetning i maiskorn:

Fettsyresammensetningen for 59122xNK603 er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Det ble analysert for 5 fettsyrer, dvs. palmitin, stearin, olje, linol og linolen. Målingene utført på 59122xNK603 viser statistiske forskjeller på tvers av forsøksfeltene for palmitin, stearin, linol og oljesyre, men også innenfor flere forsøksfelt. Verdiene er ikke konsistente for alle forsøksfeltene. Forskjellene er mindre enn 10 %, og verdiene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen.

Aminosyrer i maiskorn:

Analyser av aminosyrer er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument. Det er funnet statistiske forskjeller i middelværdi for aminosyrene mellom 59122xNK603 og kontroll for metionin, cystin, lysin, tryptofan, treonin, isoleucin, histidin, valin, leucin, arginin, fenyilalanin, glysin, alanin, asparginsyre, glutaminsyre, prolin, serin og tyrosin på tvers av forsøksfeltene. For metionin og cystin ble det ikke påvist noen statistiske forskjeller innenfor noe av forsøksfeltene. For lysin, glysin og tyrosin ble det ikke påvist statistiske forskjeller innenfor fem av de seks forsøksfeltene. For isoleucin, histidin, valin, leucin, arginin, fenyilalanin, glutaminsyre og prolin ble det ikke påvist statistiske forskjeller innenfor tre av de seks forsøksfeltene. For lysin, glysin og tyrosin ble det ikke påvist statistiske forskjeller innenfor fem av de seks forsøksfeltene. For alanin ble det ikke påvist statistiske forskjeller innenfor to av de seks forsøksfeltene. Verdiene for alle aminosyrene ligger verdiene innenfor de typiske verdiene som er rapportert i litteraturen.

Analyser av aminosyrer er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument. Det er funnet statistiske forskjeller for aminosyrene arginin, histidin, isoleusin, leucin, fenyilalanin, prolin, tryptofan, tyrosin og valin. Disse forskjellene er ikke konsistente for alle forsøksfeltene.

Verdiene ligger innenfor 10 %, og for alle aminosyrene ligger verdiene innenfor de typiske verdiene som er rapportert i litteraturen.

Vitaminer:

Vitaminer som i henhold til OECDs konsensusdokument for mais bør undersøkes for er A, B1, B2, B6, E, folat og niacin. Følgende vitaminer er ikke målt: Vit. B6 og niacin. Resultatene for vit. B1 viser for usprøytet 59122xNK603 store statistiske forskjeller (ca. 60 %) i forhold til sprøytet og kontroll fra feltforsøkene i USA og Canada. Det er ikke påvist statistiske forskjeller for vitamin B1 mellom usprøytet 59122xNK603 og kontroll for de to vekstsesongene i Chile. For de andre vitaminene er det påvist statistiske forskjeller innenfor enkelte forsøksfelter, men disse forskjellene er ikke konsistente for alle forsøksfeltene. Disse forskjellene ligger innenfor 20 % over forsøksfeltene.

Mineraler:

Med unntak for selen er mineralene som er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Mais er en viktig selenkilde i dyrefôr (Watson 1987). Feltforsøk viser statistiske

forskjeller for jern, kalsium, kobber, mangan og sink. Forskjellen er imidlertid små og ligger innenfor 10 %, og ligger også innenfor for typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen.

Sekundære metabolitter og antiernæringskomponenter:

Det er ikke funnet statistiske forskjeller for sekundære metabolitter og antiernæringskomponenter. Det er ikke målt for toksinene DIMBOA og MBOA.

Delkonklusjon:

Det er funnet statistiske forskjeller i enkeltparametre. Verdiene for de enkelte analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen. Faggruppen anser at de forskjellene som er påvist, ikke har noen helsemessig betydning.

Dokumentasjon av toksisitet og allegenisitet

Toksisitet:

Søknaden inneholder dokumentasjon på føringforsøk med renfremstilt CP4 EPSPS, PAT, Cry34Ab1 og Cry35Ab1.

Akutt oral føringstudie på mus:

Søknaden inneholder dokumentasjon på føringforsøk med renfremstilt CP4 EPSPS, PAT, Cry34Ab1 og Cry35Ab1. Føringforsøket med PAT er utført av Dow AgroSciences.

Pioneer henviser til akuttstudie på mus med CP4 EPSPS-, PAT-, Cry34Ab1- og Cry35Ab1-protein. Studiene er utført i henhold til EUs (EEC 1992), EPAs (EPA 1998a) og OECDs (OECD 1987) retningslinjer for oral akuttoksisitetsstudier. De fire proteinene er fremstilt fra bakterier. Proteinene Cry34Ab1 (dose = 2700 mg/kg kroppsvekt) og Cry35Ab1 (dose = 1850 mg/kg kroppsvekt) er føret enten hver for seg eller i blanding. I blanding er mengde Cry34Ab1 482 mg/kg kroppsvekt og Cry35Ab1 1520 mg/kg kroppsvekt. PAT dosen i forsøket er 5000 mg/kg kroppsvekt og CP4 EPSPS-dosen er 400 mg/kg. Det er benyttet 5 mus i hver av studiene med Cry-proteinene, mens med Cry-proteinene i blanding er det benyttet 5 hann- og 5 hunnmus. For de andre proteinene er det henvist til studier som er dokumentert i andre EFSA søknader. Etter 14 dager er det ikke vist tegn på toksisk påvirkning i noen av forsøkene for alle proteinene. Dyrene ble avlivet og det er ikke påvist organskader ved grov patologisk undersøkelse.

Føringforsøk på rotter:

Det er ikke utført et 13 ukers føringforsøk på rotter med 59122xNK603. Pioneer henviser til føringforsøk på rotter utført med fôr fra de enkelte maislinjene.

Fôringsforsøk på broiler:

Det er ikke utført et 42-dagers fôringsforsøk på broilere med 59122xNK603. Pioneer henviser til søknaden for 59122x1507xNK603, som Pioneer mener er tilstrekkelig dokumentasjon for 59122xNK603. Pioneers argument er at fravær av negative helseeffekter i fôringsforsøk med 59122x1507x NK603 gir tilstrekkelig vitenskapelig informasjon til å anta det vil være fravær av negative helseeffekter ved fôring med 59122xNK603.

Delkonklusjon

Faggruppen konkluderer med at det på bakgrunn av disse forsøkene er ingen grunn til å anta at den ernæringsmessige kvaliteten til den genmodifiserte maishybriden er forskjellig fra umodifisert mais.

Allergenitet:

Bt-proteiner

Til tross for vel 50 års bruk av B.t.k. som sprøytemiddel er det ingen bekreftede rapporter over øyeblikkelige eller forsinkede allergiske reaksjoner til tross for betydelig human eksponering via munn, hud og luftveier. Laboratoriestudier med pattedyr indikerer heller ingen potensielle allergiske reaksjoner mot *Bacillus thuringiensis* eller dens komponenter innbefattet delta-endotoksinet i krystallprotein. Allergiske reaksjoner mot *Bacillus thuringiensis* har vært rapportert, men disse har ikke vært tilskrevet krystallprotein.

Det har ikke vært utført immunologiske studier med de transgene produktene. Det er vist at Cry1Ac-protein binder seg til musetarmoverflaten og induserer immunologiske reaksjoner mot seg selv og mot proteiner gitt samtidig (Vazquez-Padron *et al.* 2000a, Vazquez *et al.* 1999, Moreno-Fierros *et al.* 2003, Rojas-Hernández *et al.* 2004). 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-protein som er benyttet i disse studiene, tilsvarer Cry1F-toksinet som den transgene maislinjen lager. Det er vist at domene II fra Cry1Ab og Cry1Ac 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 sondefôring 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 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 i følge søker er 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 Pioneer Hi-Bred er mengde Cry34Ab1 og Cry35Ab1 i maiskorn henholdsvis 34 µg/g - og 1,5 µg/g tørrvekt korn. Teoretiske beregninger fra faggruppen viser at dersom alt maisinntak i Europa kommer fra 59122xNK603 vil dette medføre et inntak for voksne på 310 µg Cry-protein/person/dag. Teoretiske beregninger fra faggruppen viser at for barn som spiser store porsjoner blir inntaket 295 µg Cry-protein/kg kroppsvekt/dag og for voksne 150 µg/kg kroppsvekt/dag. De totale mengdene for henholdsvis barn og voksne blir da 5000 µg/barn/dag og 9000 µg/person/dag. De mengder Cry1Ac som ga mucosal adjuvanseffekt ved sondefôring av mus var fra 0,1 µg til 100 µg (Vazquez *et al.* 1999). De adjuvansdoser som brukes for immunisering av mus og mennesker i andre sammenhenger er ofte av samme størrelsesorden, det vil si om lag samme dose brukes til mus og menneske. Det er mulig at Cry34Ab1 og Cry35Ab1 som benyttes i 59122xNK603 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 Cry34Ab1 og Cry35Ab1 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 er et problem i noen områder, bl.a. Nord-Italia. Man ville vente 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.

Uventede effekter av å sette inn nye gener kan opptre og kan føre til endret uttrykk av endogene proteiner. Det er imidlertid ikke påvist at slike effekter har skjedd med MON810 som inneholder Cry1Ab proteinet. MON810 har vært dyrket og konsumert siden 1996.

Konklusjon:

Faggruppen finner det ut fra tilgjengelige data vanskelig å vurdere om korn fra 59122xNK603 er mer allergifremkallende enn umodifisert maiskorn. På bakgrunn av foreliggende eksperimentelle studier i mus, finner Faggruppen imidlertid at muligheten for økt allergifremkallende aktivitet til 59122xNK603 med den informasjon Faggruppen har tilgang til, ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes. Faggruppen mener at siden adjuvanseffekt av Cry34Ab1 og Cry35Ab1 ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes, må det kreves av Pioneer Hi-Bred å kommentere forsøkene som viser adjuvanseffekt av Cry1Ac i forhold til muligheten for adjuvanseffekt av Cry34Ab1 og Cry35Ab1.

KONKLUSJON

Det er funnet statistiske forskjeller i enkeltparametre, men verdiene for de enkelte analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen. Faggruppen anser at disse forskjellene ikke har noen helsemessig signifikans. Faggruppen konkluderer derfor med at det på bakgrunn av den tilgjengelige informasjonen ikke er grunn til å anta at den ernæringsmessige kvaliteten til den genmodifiserte maisen 59122xNK603 er forskjellig fra umodifisert mais.

Studier viser at proteinene Cry34Ab1, Cry35Ab1, CP4 EPSPS og PAT ikke er akutt toksiske. Pioneer Hi-Bred har utført sub-kroniske studier på rotter og kyllinger med 59122xNK603. Faggruppen konkluderer med at det er lite sannsynlig at eksponering for PAT-proteinet i seg selv og i de mengder som tilføres via genmodifisert mais, er helsemessig betenkelige.

Faggruppen finner det ut fra tilgjengelige data vanskelig å vurdere om korn fra 59122xNK603 er mer allergifremkallende enn umodifisert maiskorn. På bakgrunn av foreliggende eksperimentelle studier i mus, finner Faggruppen imidlertid at muligheten for økt allergifremkallende aktivitet til 59122xNK603 med den informasjon Faggruppen har tilgang til, ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes. Faggruppen mener at siden adjuvanseffekt av Cry34Ab1 og Cry35Ab1 ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes, må det kreves av Pioneer Hi-Bred å kommentere forsøkene som viser adjuvanseffekt av Cry1Ac i forhold til muligheten for adjuvanseffekt av Cry34Ab1 og Cry35Ab1, og om slike effekter kan oppstå ved inntak av maisprodukter som inneholder de aktive Cry34Ab1 og Cry35Ab1-proteinene.

VURDERT AV

Faggruppe for genmodifiserte organismer:

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

Koordinator fra sekretariatet: Arne Mikalsen

REFERANSER

EEC 1992. EEC Methods Number B.1 Acute Toxicity (Oral).

EFSA 99, 2004. "Guidance document for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed".

EHC, 1999. Environmental Health Criteria 217. *Bacillus thuringiensis*. WHO, Geneva 1999

EPA 1998a. EPA Health Effects Test Guidelines; OPPTS 870.1100.

EPA 1998b. U.S. EPA Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.3100, 90-Day Oral Toxicity in Rodents (1998).

FAO/WHO 2003. Acute hazard exposure assessment for pesticide residues in food.

http://www.who.int/foodsafety/chem/acute_data/en/

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

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.

OECD 1987. OECD Guidelines No. 401 Acute Oral Toxicity

OECD 1998. OECD Guideline for the Testing of Chemicals Section 4: Health Effects, Number 408 (1998)

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.

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 MA, López-Revilla R, Reséndiz-Albor AA, Moreno-Fierros L., 2004. Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infect Immun.*, 72:4368-4375

Vazquez-Padron RI, Martinez-Gil AF, Ayra-Pardo C, Gonzalez-Cabrera J, Prieto-Samsonov DL, de la Riva GA., 1998. Biochemical characterization of the third domain from *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. *Biochem Mol Biol Int.*, 45(5):1011-20.

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.

Watson, S.A. (1987) Structure and Composition. In: Corn. Chemistry and Technology. S. A. Watson and P. E. Ranstead (eds). American Association of Cereal Chemists, Minnesota.