



Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet

9.05.08

Helse- og miljørisikovurdering av Monsanto's genmodifiserte maishybrid MON 89034 x MON 88017 (EFSA/GMO/NL/2007/39)

SAMMENDRAG

Helse- og miljørisikovurderingen av den herbicid- og insektsresistente maishybriden MON 89034 x MON 88017 fra Monsanto (EFSA/GMO/NL/2007/39) er utført av Faggruppe for genmodifiserte organismer under Vitenskapskomiteen for mattrygghet. Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning (DN) ber Vitenskapskomiteen for mattrygghet om å vurdere den genmodifiserte maislinjen MON 89034 x MON 88017 til bruk i næringsmidler og fôrvarer, men ikke for dyrking.

Vurderingen av den genmodifiserte maisen er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSA's nettside GMO EFSA.net. I tillegg er det benyttet informasjon fra uavhengige vitenskapelige publikasjoner i vurderingen. MON 89034 x MON 88017 er vurdert i henhold til tiltenkt bruk og i overensstemmelse med kravene i genteknologiloven, forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven, forordning 1829/2003/EF, samt kravene i EUs utsetningsdirektiv 2001/18/EF med annekser. Videre er EFSA's 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, mineraler, kritiske toksiner, metabolitter, antinæringsstoffer, allergener og nye proteiner, samt agronomiske egenskaper, potensiale for ikke-intenderte effekter på fitness, genoverføring og effekter på ikke-målorganismer.

Maishybriden MON 89034 x MON 88017 er resultat av konvensjonell kryssing mellom foreldrelinjene MON 89034 og MON 88017. Foreldrelinjen MON 89034 har fått innsatt de bakterielle genene *cry1A.105* og *cry2Ab* fra *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* og *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Cry1A.105*- og *cry2Ab2*-genene koder for δ -endotoksiner som gir plantene toleranse mot enkelte arter i ordenen *Lepidoptera*. Foreldrelinjen MON 88017 uttrykker *Cry3Bb1*- og *CP4-EPSPS*-proteiner, som er resultat av introduksjon av genene *cry3Bb1* og *cp4-epsps* fra jordbakteriene *B. thuringiensis* subsp. *kumamotoensis* og *Agrobacterium tumefaciens*. *Cry3Bb1*-proteinet gir plantene beskyttelse mot angrep fra arter i

familien bladbiller (*Chrysomelidae*). *Cp4-epsps*-genet koder for enzymet 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfatsyntetase, som omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfat, en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. I motsetning til plantens enzym er det bakterielle enzymet også aktivt ved nærvær av N-fosfonometyl glycin (glyfosat). Foreldrelinjene MON 89034 og MON 88017 er tidligere vurdert av Faggruppe for genmodifiserte organismer. Produkter av MON 89034 x MON 88017 vil bli markedsført under handelsnavnet YieldGard VT PRO™¹.

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 hybridene MON 89034 x MON 88017 til bruk som mat og fôr.

Ingen av proteinene som blir uttrykt som følge av genmodifiseringen har likheter med kjente allergener eller egenskaper som tilsier at de er allergener. Det er imidlertid ikke vurdert om de uttrykte toksinene Cry1A.105, Cry2Ab2 og Cry3Bb1 kan ha adjuvanseffekter.

Faggruppen finner det vanskelig å vurdere om næringsmidler og fôrvarer fra maisen MON 89034 x MON 88017 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 MON 89034 x MON 88017 i forhold til umodifisert mais med den informasjon vi har tilgang til, ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes. Da mengde Cry1A.105, Cry2Ab2 og Cry3Bb1 i maiskorn kan være 11 µg/g tørrvekt til sammen, mener Faggruppen at det må kreves av Monsanto å kommentere forsøkene som viser adjuvanseffekt av det beslektede Cry1Ac.

Søknaden gjelder godkjenning av maislinjen MON 89034 x MON 88017 for import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av maislinjen. Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av maislinjen i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Risiko for utkryssing med dyrkede sorter vurderes til å være ubetydelig. Ved foreskrevne bruk av maislinjen MON 89034 x MON 88017 antas det ikke å være risiko for negative effekter på målorganismer, ikke-målorganismer eller på abiotisk miljø i Norge.

Samlet vurdering

Faggruppen finner det lite trolig at bruk av maislinjen MON 89034 x MON 88017 vil medføre endret risiko for helse og miljø i forhold til annen mais, men påpeker kunnskapshull knyttet til om Cry-proteinene i MON 89034 x MON 88017 kan virke som adjuvant.

NØKKELORD

Genmodifisert mais, MON 89034 x MON 88017, insektsresistens, herbicidtoleranse, *cry1A.105*, *cry2Ab2*, *cry3Bb1*, CP4 EPSPS, helsemessig trygghet, helse, adjuvans, miljø, forordning 1829/2003/EF

INNHALDSFORTEGNELSE

SAMMENDRAG	1
VURDERT AV (MEDLEMMER AV FAGGRUPPE GENMODIFISERTE ORGANISMER)	3
BAKGRUNN	4
OPPDRAG FRA MATTILSYNET OG DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING.....	4
RISIKOVURDERING	5
KONKLUSJON	19
REFERANSER	20

VURDERT AV

Faggruppe for genmodifiserte organismer:

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

Koordinator fra sekretariatet:

Arne Mikalsen, Merethe Aasmo Finne

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 MON 89034 x MON 88017 fra Monsanto (EFSA/GMO/NL/2007/39). Maislinjen 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, og ble fremmet og anbefalt av nederlandske myndigheter i februar 2007. Søknaden ble lagt ut på EFSA-nett 20. september 2007, med frist på 90-dager for innspill fra EU- og EØS/EFTA-landene. Norge har ikke tidligere uttalt seg om maishybriden. Begge foreldrelinjene er søkt godkjent til import, prosessering, mat og fôr i EU/EØS-området, og tidligere vurdert av Faggruppen (VKM 2007 a,b).

OPPDRAK FRA MATTILSYNET OG DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING

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

Søknad EFSA/GMO/NL/2007/39, genmodifisert maishybrid MON 89034 x MON 88017, ble lagt ut på EFSA-nett 20. september 2007. Faggruppe for genmodifiserte organismer skal i tråd med oppdragsbrev utarbeide helse- og miljørisikovurdering av maislinjen til import og industriell prosessering, samt til bruk som næringsmiddel og fôrvarer. Søknaden omfatter ikke dyrking.

Vurderingen av MON 89034 x MON 88017 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/NL/2007/39 (MON 89034 x MON 88017).

Unik kode: MON-89034-3 x MON-88017-3.

Status i EU: Søknad under 1829/2003/EF. EFSAAs frist for innspill er 20.12.07.

Ønsket svarfrist til Mattilsynet/DN: 20. desember 2007.

RISIKOVURDERING

1. Innledning

Helse- og miljørisikovurderingen av den genmodifiserte maishybriden MON 89034 x MON 88017 er gjort i henhold til tiltenkt bruk, basert på informasjon som er gjort tilgjengelig på EFSAAs nettside GMO EFSA-nett knyttet til søknader om godkjenning av maishybriden MON 89034 x MON 88017 og foreldrelinjene MON 89034 og MON 88017 (EFSA/GMO/NL2007/39; EFSA/GMO/NL/2007/37; EFSA/GMO/CZ/2005/27). I tillegg er det benyttet uavhengige vitenskapelige publikasjoner med referee i vurderingene. I henhold til Monsanto 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.

Vurderingen er gjort i overensstemmelse med kravene i genteknologiloven, forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven, forordning 1829/2003/EF, samt kravene i EUs utsetningsdirektiv 2001/18/EF med annekser. 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 2006).

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, dvs. ved en noe forenklet risikovurdering. 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.

1.1. Beskrivelse av egenskaper(er) og virkningsmekanismer

Hybriden MON 89034 x MON 88017 er dannet ved tradisjonell kryssingsforedling mellom to innavlede linjer, avledet av de genmodifiserte maislinjene MON 89034 og MON 88017.

Foreldrelinjen MON 89034 har fått innsatt de bakterielle genene *cry1A.105* og *cry2Ab2*, isolert fra *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* og *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Cry1A.105*- og *cry2Ab2*-genene koder for δ -endotoksiner som gir plantene toleranse mot enkelte arter i ordenen *Lepidoptera*, eksempelvis *Ostrinia nubilalis* (maispyralide), *Sesamia* ssp., *Agrostis ipsilon* (stort jordfly), *Spodoptera* sp. ('fall armyworm') og *Helicoverpa zea* ('corn earworm').

Foreldrelinjen MON 88017 uttrykker *Cry3Bb1*- og *CP4-EPSPS*-proteiner, som er resultat av introduksjon av genene *cry3Bb1* og *cp4-epsps* fra jordbakteriene *B. thuringiensis* subsp. *kumamotoensis* og *Agrobacterium tumefaciens*. *Cry3Bb1*-proteinet gir plantene toleranse mot angrep fra arter i familien bladbiller (*Chrysomelidae*), som *Diabrotica* ssp. *Cp4-epsps*-genet koder for enzymet 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfatsyntetasen (CP4 EPSPS), som omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfat, en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. N-fosfonometylglycin (glyfosat) hemmer generelt EPSPS-enzymet og blokkerer derved biosyntesen av aromatiske aminosyrer i planter. I motsetning til plantens enzym er det bakterielle

enzymet også aktivt ved nærvær av glyfosat. Glyfosat er relativt ufarlig for dyr da de mangler EPSPS-enzymet.

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 MON 89034 x MON 88017 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom maislinjene MON 89034 og MON 88017.

2.2. Evaluering av foreldrelinjer

2.2.1. Maislinje MON 89034

Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

Til transformasjon er brukt *Agrobacterium*-mediert transformering av umodne maisceller. Plasmidet PV-ZMIR245 som inneholder to rekombinante DNA fragmenter ble benyttet til å transformere celler fra en umodifisert maislinje. De to rekombinante DNA-fragmentene (T-DNA I og T-DNA II) er satt inn i maisgenomet. T-DNA I inneholder en *cryIA.105* og en *cry2Ab2* ekspresjonskassett, mens T-DNA II inneholder en *nptII* ekspresjonskassett. Transformanter ble selektert ved at de overlevde og vokste i nærvær av paromomycin. Påfølgende innavl på F₁-generasjonen førte til at T-DNA I (*cryIA.105/cry2Ab2* kassetten) ble segregert fra T-DNA II (*nptII*-kassetten). MON 89034-plantene inneholder bare rekombinant DNA-fragment som inneholder *cryIA.105* og *cry2Ab2* genkassetten (T-DNA I), mens planter som inneholder *nptII*-kassetten (T-DNA II) ble eliminert. T-DNA I fragmentet inneholder to ekspresjonskassetter. Den ene kassetten inneholder ekspresjonskassetten som koder for Cry1A.105-protein og som inneholder promoteren P-e35S samt ledesequens for blomkålmosaikkvirus (CaMV) 35S RNA, 5' ikke-translatert ledesequens hvete klorofyll a/b/ bindingsprotein (L-Cab), intron fra ris aktingen (I-Ract1), *cryIA.105*-sekvenser som er optimalisert for ekspresjon i enfrøbladet planter, og 3' ikke-translatert sekvens fra hvete "heat shock"-protein 17.3 (T-Hsp17), som avslutter transkripsjonen. *Cry2Ab2* ekspresjons-kassetten som danner Cry2Ab2-proteinet består av 35S promoter fra brunrot mosaikkvirus (P-FMV), I-Hsp 70 det første intronet fra mais "heat shock" protein-70 genet, *cry2Ab2* sekvens med et modifisert kodon CS-Cry2Ab2 som er limt til et kloroplast overføringspeptid fra mais ribulose 1,5-difosfat karboksylase "small subunit" inkludert genets første intron (TS-SSU-CTP), samt 3' ikke-translatert område fra nopalinsyntase (T-nos) området fra *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA. T-nos avslutter (terminerer) transkripsjonen. DNA-fragmentet inneholder ikke antibiotikaresistensgener.

Beskrivelse av de innsatte genene

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

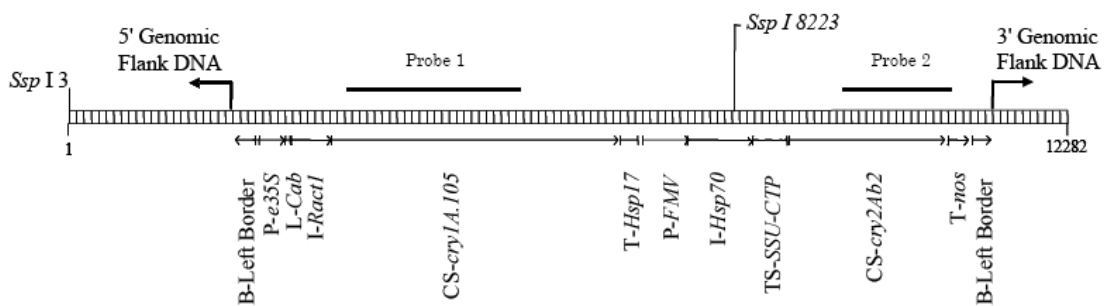
CryIA.105 ekspresjonskassett

- a) *P-e35S* promoter og 9 bp ledesequens fra blomkål mosaikkvirus (CaMV) 35S RNA
- b) *L-Cab* 5' ledesequens hvete klorofyll a/b/ bindingsprotein, uttrykkes ikke i planten
- c) *ract1* intron intron fra risaktin-genet

- d) *CS-CryIA.105* syntetisk gen med sekvenser fra genene *cryIAb*, *cryIAc* og *cryIF*. Genene stammer fra *Bacillus thuringiensis* (se figur 2)
- e) *T-Hsp17* 3' DNA sekvens som avslutter transkripsjonen, kommer fra hvete "heat shock" protein 17.3, uttrykkes ikke i planten

Cry2Ab2 ekspresjonskasset

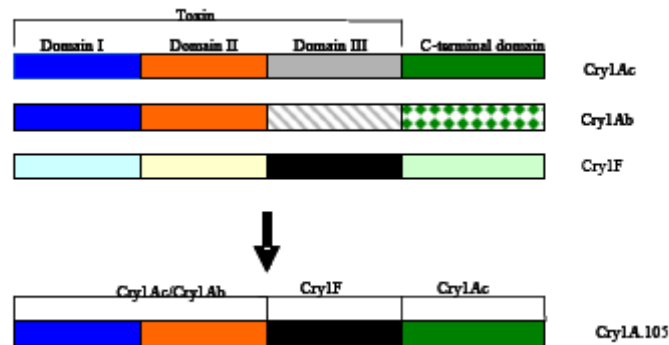
- a) *P-FMV35S* promoter fra brunrot mosaikkvirus
- b) *I-Hsp 70* det første intronet fra mais "heat shock" protein-70 gen
- c) *TS-SSU-CTP* kloroplast-overføringspeptid fra mais ribulose 1,5-difosfat karboksylase "small subunit," inkludert det første intronet.
- d) *Cry2Ab2* gen som koder et syntetisk Cry2Ab2- protein, fra *Bacillus thuringiensis*
- e) *T-nos* 3' DNA sekvens som avslutter transkripsjonen, kommer fra nopaline syntase (nos) genet fra *Agrobacterium tumefaciens*, uttrykkes ikke i planten.



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

Karakterisering av geninnsettingen

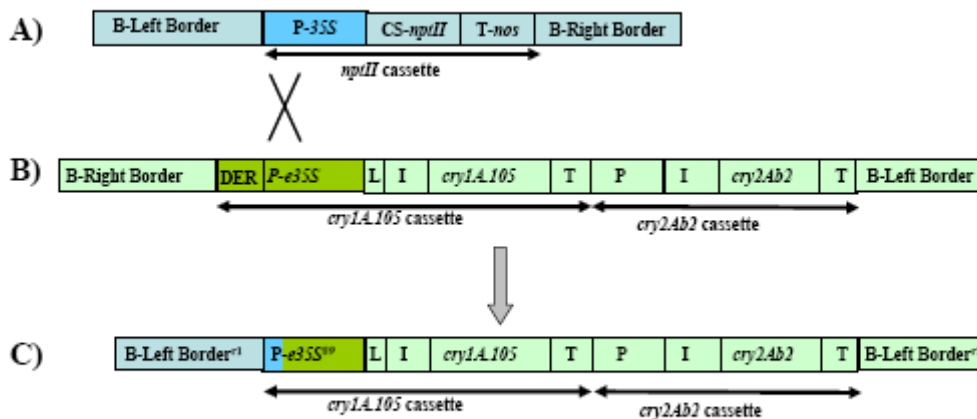
Den genmodifiserte maislinjen MON 89034 uttrykker insektsresistens. Bakgrunnen for insektsresistens er at planten uttrykker en variant av bakterieproteinet Cry1A.105 og Cry2Ab2. Cry1A.105- og Cry2Ab2- proteinene, som uttrykkes av *cryIA.105* og *cry2Ab2* genene, er toksiner som gir planten toleranse mot larver i sommerfuglordenen *Lepidoptera*. Cry1A.105-proteinet er et kimært protein som består av domene I og II fra Cry1Ac eller Cry1Ab, domene III fra Cry1F, og C-terminal domene fra Cry1Ac. Cry1Ab- og Cry1Ac-proteinene har 100 % aminosyresekvensidentitet med domene I og II, se figur 2. Cry1A.105-proteinets aminosyresekvens-identiteten til Cry1Ac-, Cry1Ab-, og Cry1F- proteinene er henholdsvis 93,6 %, 90,0 %, og 76,7 %. Basesekvensene i det syntetiske *cryIA.105*-genet og *cry2Ab2*-genet stammer fra jordbakterien *Bacillus thuringiensis*.



Figur 2. Skjematisk tegning over domenen i Cry1A.105 og deres likhet til tilsvarende domener i Cry1Ab, Cry1Ac og Cry1F.

Molekylærbiologiske analyser viser at det rekombinante fragmentet i planten inneholder de samme gener og genelementer som er på det tilsvarende T-DNA I fragmentet i plasmidet PV-ZMIR245. Både Cry1A.105- og Cry2Ab2-proteinet som uttrykkes i maiskorn er undersøkt med Western-blot analyse og densitometri, SDS-PAGE og densitometri, trypsinbehandling av proteinene og peptidkartlegging med MALDITOF massespektrometri, Southern blot, analyse av N-enden til proteinet, samt glykosyleringsanalyse. Proteinene er undersøkt for henholdsvis enzymaktivitet og bioaktivitetassay. Bioaktivitet-assayene viser at rensset planteprodusert Cry1A.105 og *E. coli* produsert Cry1A.105-protein har en veksthemmende aktivitet (EC_{50}) på målorganismen på henholdsvis $0,0074 \pm 0,0017 \mu\text{g}$ Cry1A.105/ml diett (variasjonsbredde 0,0055 til 0,0089 μg Cry1A.105/ml) og $0,0120 \pm 0,0062 \mu\text{g}$ Cry1A.105/ml diett (variasjonsbredde 0,0053 til 0,0170 μg Cry1A.105/ml). For Cry2Ab2 er tilsvarende EC_{50} -verdier henholdsvis $0,16 \pm 0,01 \mu\text{g}$ Cry2Ab2/ml diett (variasjonsbredde 0,16 til 0,17 μg 2Ab2/ml) og $0,16 \pm 0,04 \mu\text{g}$ Cry2Ab2/ml diett (variasjonsbredde 0,13 til 0,20 μg 2Ab2/ml). Analysene viser at Cry1A.105- og Cry2Ab2- proteinene er strukturelt og funksjonelt like de *E. coli*-produserte proteinene. Det ble ikke påvist glykoliserings seter på proteinene.

PCR-analyser av det rekombinante DNA fragmentet på 9317 bp i MON 89034 viser at flankesekvensene til fragmentet er genomisk DNA fra mais. Flankerende sekvenser til dette rekombinante DNA-fragmentet er sekvensert, ca. 200 bp oppstrøms (5'-enden til genet) og ca. 200 bp nedstrøms (3'-enden til genet). I den genomiske 3'-enden er det påvist en deleksjon på 57 bp i MON 89034 i forhold til umodifisert mais, i tillegg er det i 5'-enden påvist et innskudd på 10 bp. PCR analysene viser at både *cry1A.105* og *cry2Ab2* DNA-sekvensene er identiske til de korresponderende sekvensene på plasmidet PV-ZMIR245. Sekvenseringsdata viser at e35S promoteren som regulerer ekspresjonen av *cry1A.105* er blitt modifisert til en kortere versjon ved at det ikke inneholder det dupliserte forsterkerelementet. Høyre grense, dvs 5'-enden, til T-DNA I fragmentet i plasmidet PV-ZMIR245 er fjernet ved innsettingen og erstattet med en forkortet versjon av venstre grense, se figur 3. T-DNA II elementer, som *npII*-genet og unike T-DNA II DNA sekvenser, ble ikke påvist i MON 89034 ved bruk av Southern-blot metode.



Figur 3. Beskrivelse av rekombinasjonsprosessen som viser modifiseringen i 5'-enden av innskuddet.

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

Mengde Cry1A.105- og Cry2Ab2- protein i korn er målt til henholdsvis $5,9 \pm 0,77 \mu\text{g/g}$ tørrvekt (variasjonsbredde = 4,7 – 7,0) og $1,3 \pm 0,36 \mu\text{g/g}$ tørrvekt (variasjonsbredde = 0,77 – 2,1), og i furasje til henholdsvis $42 \pm 9,4 \mu\text{g/g}$ tørrvekt (variasjonsbredde = 20 – 56) og $38 \pm 14 \mu\text{g/g}$ tørrvekt (variasjonsbredde = 15 – 55). Prøvene som er analysert stammer fra fem feltforsøk utført i USA i 2005. Det er tatt ut tre prøver fra hvert feltforsøk. I feltforsøkene i Argentina er mengde av

Cry1A.105- og Cry2Ab2- protein i korn målt til henholdsvis $2,6 \pm 0,36$ µg/g tørrvekt (variasjonsbredde = 1,9 – 3,2) og $0,95 \pm 0,16$ µg/g tørrvekt (variasjonsbredde = 0,67 – 1,3). Prøvene som er analyserte stammer fra fem feltforsøk fra vekstsesongen 2004-2005. Det er tatt ut tre prøver fra hvert feltforsøk.

Teoretiske analyser av mulige polypeptider fra hver leseramme v.h.a. allergen (AD6)-, toksin (TOXIN5)- og peptid (ALLPEPTIDES)-databaser viser ingen strukturelle likheter til allergener, toksiner og farmakologiske aktive proteiner. Resultatene fra disse teoretiske analysene viser at det er lite sannsynlig at det dersom noen av disse leserammene skulle bli transkribert vil resultere i polypeptider som medfører potensielle toksiske eller allergene konsekvenser.

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

Krysning over syv generasjoner og tre selvpollineringsgenerasjoner viser at det rekombinante fragmentet *cry1A.105* og *cry2Ab2* 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 2007b). Faggruppen konkluderer med at karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i MON 89034 er tilfredsstillende

2.2.2. Maislinje MON 88017

Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

Til transformasjon er brukt *Agrobacterium*-mediert transformering av umodne maisceller. Plasmidet PV-ZMIR39 ble benyttet til å transformere celler fra den umodifiserte maislinjen A x Hi-II. Et rekombinant DNA fragment på ca 7100 basepar (bp) er satt inn i maisgenomet. Fragmentet inneholder to ekspresjonskassetter. Den ene kassetten inneholder risaktin-promoteren P-ract1, et ract1 intron, et optimalisert kloroplast overføringspeptid (CTP2), *cp4 epsps* genet og NOS3 terminatoren. Den andre kassetten inneholder en 35S-promoter (P-e35S), en ikke uttrykt ledersekvens (wt CAB) fra hveteklorofyll a/b-bindende protein genet, et ract1 intron, et endret *cry3Bb1*-gen og et 3'-ende terminatorområde (tahsp17 3') fra hvete "heat shock" genet. DNA-fragmentet inneholder ikke antibiotikaresistensgen. Transformanter ble selektert ved at de overlevde og vokste i nærvær av glyfosat.

Beskrivelse av de innsatte genene:

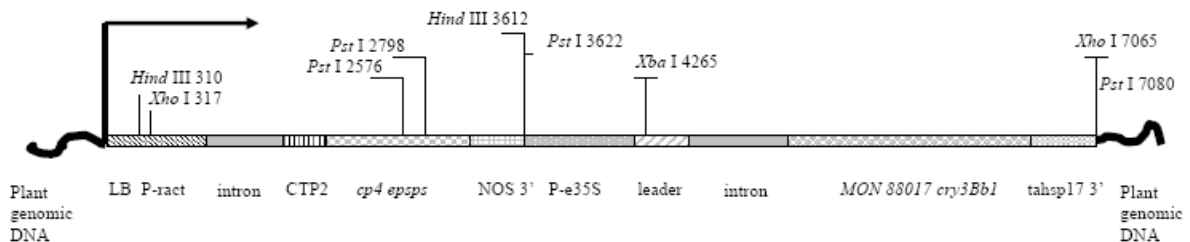
Southern blot og PCR har blitt brukt for å karakterisere det rekombinante DNA-fragmentet i planten. Molekylærbiologisk karakterisering viser at det er satt inn bare en kopi av rekombinant DNA-fragmentet i maisens genom. Dette fragmentet inneholder:

Cp4 epsps- ekspresjonskassett

- a) P-ract1 promoter fra risaktin-gen
- b) ract1 intron intron fra risaktin-gen
- c) CTP2 DNA sekvens som koder for kloroplastoverføringspeptid, fra *Arabidopsis thaliana*
- d) *Cp4 epsps* DNA sekvenser som koder for CP4 EPSPS- protein, fra *Agrobacterium* stamme CP4
- e) NOS 3' 3' DNA sekvens som avslutter transkripsjonen, kommer fra nopalinsyntase gen til *Agrobacterium tumefaciens*, uttrykkes ikke i planten

Cry3Bb1-ekspresjonskasset

- a) P-e35S promoter fra blomkålmosaikk virus
- b) wt CAB 5' DNA ledersekvens fra hveteklorofyll a/b-bindende protein gen, uttrykkes ikke i planten
- c) ract1 intron intron fra risaktin-gen
- d) *Cry3Bb1* gen som koder et syntetisk Cry3Bb1- protein, fra *Bacillus thuringiensis* subsp. *kumamotoensis*
- e) tahsp17 3' 3' DNA sekvens som avslutter transkripsjonen, kommer fra hvete "heat shock" gen, uttrykkes ikke i planten.



Figur 4. Rekombinant DNA fragment i maisens genom. Hind, Pst, Xba og Xho er seter for de respektive restriksjonsenzymene.

Den genmodifiserte maislinjen MON 88017 uttrykker glyfosattoleranse og insekstresistens. Bakgrunnen for glyfosattoleransen er *cp4-epsps*-genet, som stammer fra jordbakterien *Agrobacterium tumefaciens*, og som koder for 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfatsyntetase. Enzymet omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfat, som er en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. I motsetning til hos dyr, inneholder alle planter og mikroorganismer dette enzymet. Dyr må dermed få aromatiske aminosyrer fra føden. Plantens enzym er imidlertid sensitiv for glyfosat, mens det mikrobielle enzymet er tolerant.

Bakgrunnen for insekstresistens er at planten uttrykker en variant av bakterieproteinet Cry3Bb1. Cry3Bb1- proteinet, som uttrykkes av *cry3Bb1* gen, er et naturlig toksin som gir planten toleranse mot arter i ordenen *Coleoptera*. *Cry3Bb1* gen stammer fra jordbakterien *Bacillus thuringiensis* subsp. *kumamotoensis*.

Molekylærbiologiske analyser viser at det rekombinante fragmentet i planten inneholder de samme gener og genelementer som er på det tilsvarende fragmentet i plasmidet PV-ZMIR39. Både CP4 EPSPS- og Cry3Bb1-proteinet som uttrykkes i maiskorn er undersøkt med Western-blot analyse og densitometri, SDS-PAGE og densitometri, MALDITOF massespektrometri samt glykosyleringsanalyse. Proteinene er undersøkt for henholdsvis enzymaktivitet og bioaktivitetsassay. Analysene viser at CP4 EPSPS- og Cry3Bb1- proteinene er strukturelt og funksjonelt like de *E. coli*-produserte proteinene. Det ble ikke påvist glykoliserings seter på proteinene. Genene på det rekombinante DNA-fragmentet i MON 88017 uttrykker EPSPS-protein som er identisk med proteinet som uttrykkes i jordbakterien *Agrobacterium* stamme CP4, mens i Cry3Bb1 proteinet er 6 aminosyrer endret i forhold til proteinet som uttrykkes i jordbakterien *Bacillus thuringiensis* subsp. *kumamotoensis*.

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

Mengde CP4-EPSPS i fôr og korn er målt til henholdsvis 16 µg/g ferskvekt (SD=2,1; variasjonsbredde = 12 - 19) og 5,1 µg/g ferskvekt (SD = 0,89; variasjonsbredde = 3,7 - 6,3). Mengde Cry3Bb1 protein i

fôr og korn er målt til henholdsvis 27 µg/g fersksvekt (SD = 5,5; variasjonsbredde = 22 - 39) og 13 µg/g fersksvekt (SD = 3,1; variasjonsbredde = 8,7 - 19). Prøvene som er analyserte stammer fra tre feltforsøk utført i USA i 2002. Det er tatt ut tre prøver fra hvert feltforsøk.

Mengde av Cry3Bb1 og EPSPS protein i korn er i feltforsøkene i Argentina målt til henholdsvis 9,4 µg/g fersksvekt (SD = 2,7; variasjonsbredde = 6,9 - 16) og 4,0 µg/g fersksvekt (SD = 1,1; variasjonsbredde = 3,2 - 6,5). Prøvene som er analyserte stammer fra fire feltforsøk fra vekstsesongen 2003-2004. Det er tatt ut tre prøver fra hvert feltforsøk.

Flankerende sekvenser til det rekombinante DNA-fragmentet i planten er sekvensert, 878 bp oppstrøms og ca. 1000 bp nedstrøms. Teoretiske analyser av mulige polypeptider fra hver leseramme v.h.a. allergen (AD4)-, toksin (TOXIN5)- og peptid (ALLPEPTIDES)-databaser 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 det 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

Krysning over syv generasjoner og tre selvpollineringsgenerasjoner viser at det rekombinante Cry3Bb1/EPSPS-fragmentet er stabilt inkorporert i maisgenomet.

Delkonklusjon

Faggruppen har tidligere vurdert karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i MON 88017, og de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av proteinet til å være tilfredsstillende (VKM 2007a).

2.2.3. Hybriden MON 89034 x MON 88017

Molekylær karakterisering

MON 89034 x MON 88017 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom maislinjene MON 89034 og MON 88017. Molekylærbiologiske analyser viser at de rekombinante fragmentene i planten inneholder de samme gener og genelementer som er i foreldrelinjene MON 88017 og MON 88017. Både CP4 EPSPS-, Cry3Bb1-, Cry1A.105- og Cry2Ab2-proteinene som uttrykkes i maiskorn er undersøkt med Southern-blot analyse. Flankerende sekvenser til de rekombinante DNA-fragmentene i MON 89034 x MON 88017 er ikke sekvensert. Siden MON 89034 x MON 88017 er fremkommet ved konvensjonell kryssing mellom MON 89034 og MON 88017 hevder Monsanto at sekvensene i og rundt de respektive fragmentene er uendret. Monsanto har lagt ved dokumentasjon over analyser av åpne leserammer for både MON 89034 og MON 88017. Analysene er utført høsten 2007. Det er ikke vist at innsettingen av de rekombinante fragmentene har medført nye leserammer.

Analyser dokumentert i søknad for MON 88017 av enzymatisk aktivitet av CP4 EPSPS-proteinene viser ingen forskjell mellom plante- og bakterieprodusert protein. Fordøyelighetstest viste også at CP4 EPSPS-proteinene fordøyes raskt i simulert mage- og tarmsaft. Fordøyelighetstest dokumentert i søknadene for MON 88017 og MON 89034 viser at Cry3Bb1-, Cry1A.105- og Cry1Ab-proteinene fordøyes raskt i simulert magesaft. Cry3Bb1-, Cry1A.105- og Cry2Ab2-proteinene består av en proteaseresistent og en proteasefordøyelig del. I insektarmen vil den proteasefordøyelige delen spaltes til aminosyrer, mens den resistente delen ikke blir fordøyd. I simulert tarmsaft fra mennesker fordøyes fullengde proteinene raskt. Den proteaseresistente delen av proteinene er etter 24 timer spaltet i minst 3 biter.

Informasjon vedr. uttrykk av introduserte gener

Søker opplyser om at uttrykk av proteinene Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1 og CP4 EPSPS ble målt i feltforsøk i USA i 2005. Forsøkene ble lagt ut på 5 ulike lokaliteter i form av fullstendig randomiserte blokkdesign med 3 gjentak. En ikke-transgen maislinje med tilsvarende genetisk bakgrunn ble brukt som kontroll. I tillegg var foreldrelinjene MON 89034 og MON 88017 inkludert i forsøkene. Det ble

foretatt analyser av prøver fra hele planter, samt prøver av fôr, røtter, pollen og frø på til sammen 7 ulike utviklingsstadier. I følge dokumentasjon fra søker var nivåene av målte proteinprodukter i vegetativt vev og frø i overensstemmelse med variasjonsområdene for de respektive foreldrelinjene. Nivået av Cry1A.105-protein ble målt til henholdsvis $5,6 \pm 1,3$ µg/g tørrvekt (TV) (variasjonsområde 1,9-7,5), 48 ± 13 µg/g TV (31-84) og $16 \pm 1,7$ µg/g TV (14-20) for henholdsvis frø, fôr og pollen i gjennomsnitt over forsøkssteder. Tilsvarende viste analysene av Cry2Ab2 $1,3 \pm 0,26$ µg/g TV (0,82-1,9) i frø, $44 \pm 7,4$ µg/g TV (30-57) i fôr og $0,62 \pm 0,13$ µg/g TV (0,50-0,96) i pollen. Videre opplyses det om at uttrykk av Cry3Bb1 og CP4 EPSPS ble målt til henholdsvis $4,1 \pm 2,3$ µg/g TV (1,3-9,7) og $3,4 \pm 0,68$ µg/g TV (2,2-4,7) i frø, $50 \pm 9,1$ µg/g TV (37-70) og $55 \pm 8,9$ µg/g TV (38-69) i fôr, samt $15 \pm 3,4$ µg/g TV (11-24) og 320 ± 89 µg/g TV (200-550) i pollen.

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

Søker viser til spaltingsdata fra kryssinger over flere generasjoner med foreldrelinjene MON 89034 og MON 88017 og resultater fra en kryssingsgenerasjon med hybridene for å demonstrere genetisk stabilitet. Videre viser Southern analyser av de rekombinante innskuddene i MON 89034 x MON 88017-genomet at det er molekylær ekvivalens og identisk kopitall med de rekombinante DNA-innskuddene i foreldrelinjene.

Delkonklusjon

Hybriden MON 89034 x MON 88017 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom maislinjene MON 89034 og MON 88017. 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 Cry1A.105-, Cry2Ab2-, Cry3Bb1- og CP4 EPSPS-proteiner i vegetativt vev og frø er sammenlignbare med uttrykk av tilsvarende proteinprodukter i foreldrelinjene.

3. Komparative analyser

3.1. Analyser av ernæringsmessige komponenter

Analyser av variasjon i fenotype og agronomiske karakterer for foreldrelinjene MON 89034 og MON 88017 er undersøkt i mange feltforsøk på en rekke lokaliteter. MON 88017 har blitt testet i feltforsøk i Argentina og USA siden 2001. MON 89034 har blitt testet i ni feltforsøk i USA i 2004. Maishybriden MON 89034 x MON 88017 er blitt testet i fem feltforsøk i USA i 2004.

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 ± 20 %.

Hovedkomponenter i maiskorn og andre plantedeler

For MON 89034 x MON 88017 er valget av analyseparametere gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002). Det er foretatt forskjellige analyser av hovedkomponenter for fôr og korn. For fôr ble det analysert for aske, fett, protein, vann, ADF (acid detergent fibre), NDF (neutral detergent fibre), fosfor, kalsium og karbohydrater. For korn ble det analysert for 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 fytinsyre og raffinose. Analysene ble utført under god laboratoriepraksis (GLP). Seksten komponenter ble ekskludert fra statistisk analyse fordi >50 % av observasjonene var ved eller lavere enn kvantifiseringsgrensen. Totalt ble det utført 366 statistiske sammenligninger mellom MON 89034 x

MON 88017, isogenetisk kontroll (LH198 × LH172) og femten konvensjonelle referansehybrider. Analyser viser at av disse 366 sammenligningene ble det ikke påvist statistiske forskjeller for 279 sammenligninger. For de signifikante statistiske forskjellene som er funnet ligger verdiene innenfor 99 % toleranseintervall, og innenfor typiske verdier for mais som er rapportert i litteraturen.

For protein og karbohydrater er det funnet statistiske forskjeller i maiskorn, og for protein i fôr. Forskjellen i korn og fôr er mindre enn 10 %.

Fettsyresammensetning i maiskorn

Fettsyresammensetningen er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Det ble analysert for 9 fettsyrer. For tre fettsyrer er det funnet statistiske forskjeller over alle feltene. Statistisk analyser over alle feltene viser statistiske forskjeller på under 10 % for de tre fettsyrene. For alle fettsyrene ligger verdiene innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen.

Aminosyrer i maiskorn

Både essensielle og ikke-essensielle aminosyrer ble analysert. Det er analysert for 18 aminosyrer. For 15 aminosyrer er det funnet statistiske forskjeller fra kontroll både ved kombinasjon av alle feltene og over ett eller to av de fem feltene. De statistiske forskjellene er lavere enn 12 %, og verdiene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen.

Vitaminer

Vitaminer som det i henhold til OECDs konsensusdokument for mais bør undersøkes for, er B1, B2, B6, E, folinsyre, niacin, vitamin A og vitamin C. Følgende vitaminer er ikke målt: vitamin A og vitamin C. Det er ikke funnet statistiske forskjeller for alle målte vitaminer over alle feltene. For fire vitaminer er det målt statistiske forskjellene over mer enn ett felt, men færre enn fem felt. Verdiene ligger innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen.

Mineraler

Med unntak for selen er mineralene som er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Natriuminnholdet var lavere enn påvisningsgrensen. For kalsium og mangan er det funnet statistiske forskjeller over alle feltene. Forskjellene er mindre enn 12 %. Analyser viser forskjeller innenfor ett felt og også mellom færre enn fem felt for flere mineraler. Verdiene ligger innfor det som er typiske verdier som er rapportert i litteraturen og innenfor det som er påvist for de femten kontrollhybridene.

Sekundære metabolitter og antiernæringsstoffer

Det er funnet statistiske forskjeller for ferul- og p-coumarinsyre over alle forsøksfeltene. Verdiene ligger innenfor 10 %. For de andre sekundære metabolittene og antiernæringsstoffer er det ikke funnet store statistiske forskjeller. Det er ikke målt for toksinene DIMBOA og MBOA.

3.2. Agronomiske egenskaper

Søker opplyser at det er gjennomført feltforsøk med maislinjen MON 89034 x MON 88017 på fem lokaliteter i USA i 2005. Hvert forsøksfelt bestod av et fullstendig randomisert blokkdesign med tre gjentak. Femten kommersielt tilgjengelige hybridsorter ble benyttet som referansmateriale i forsøkene. I tillegg ble det benyttet en ikke-transgen maislinje med tilsvarende genetisk bakgrunn som kontroll (LH198 × LH172). Det er foretatt registreringer av en rekke agronomiske og morfologiske karakterer knyttet til reproduksjon, spredning, vegetativ vekst, sjukdoms- og insektsresistens, samt toleranse mot ulike abiotiske stressfaktorer (tørke, vind, næringsmangel etc.). Det er foretatt statistiske analyser innen steder og kombinerte analyser over steder for hver karakter. De kombinerte analysene viser signifikante forskjeller ($p \leq 0,05$) mellom MON 89034 x MON 88017 og kontrollinjen for karakterene legde, frøavling, samt tidlighet målt som antall dager til dannelse av silke. Gjennomsnittsverdiene for disse parametrene ligger imidlertid innenfor variasjonsområdene for referansesortene og 99 % toleranseintervall som er presentert i søknaden. For de øvrige karakterene ble det ikke funnet signifikante forskjeller

Variansanalyser innen steder viser signifikante forskjeller ($p \leq 0,05$) for karakterene 'antall dager til silking', lengde, tørrstoffinnhold og avling på enkelte av lokalitetene. Søker konkluderer med at observerte verdier av fenotypiske og agronomiske karakterer ligger innenfor forventet variasjonsområde for mais. Monsanto viser også til at feltforsøk med foreldrelinjene MON 89034 og MON 88017 på en rekke lokaliteter i USA og Argentina ikke har avdekket signifikante forskjeller i forhold til kontrollsorter med hensyn på agronomiske karakterer.

3.3. Delkonklusjon

Analysene av ernæringsmessige viktige komponenter viser statistiske forskjeller i enkeltparametere. Verdiene for de enkelte analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen. Resultatene fra undersøkelsene av agronomiske og morfologiske karakterer viser at, med unntak herbicidresistens og for toleranse mot målorganismene er det ingen eller små forskjeller mellom MON 89034 x MON 88017 og kontrollsorter.

4. Dokumentasjon av toksisitet og allergenitet

4.1. Toksisitet

For CP4 EPSPS-proteinet og Cry-proteinene henviser Monsanto til studier som er dokumentert i andre søknader.

Føringsforsøk på broiler

Søknaden inneholder dokumentasjon fra 42-dagers føringsforsøk på broilere. 600 dyr, 300 av hvert kjønn, ble fordelt på seks grupper og føret med henholdsvis mais fra MON 89034 x MON 88017, en umodifisert kontrollhybrid og fire kommersielle umodifiserte referansesorter. Det ble ikke påvist vesentlige endringer ved føring med maiskorn fra MON 89034 x MON 88017, kontroll-linje og de tre referansehybridene.

Subkronisk føringsforsøk på rotter

Monsanto har ikke foretatt 13 ukers føringsforsøk med rotter.

4.2. Allergenitet:

Bt-proteiner

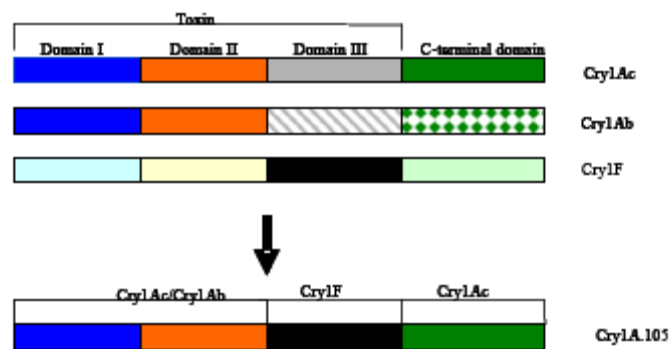
Til tross for vel 50 års bruk av B.t.k. som sprøytemiddel er det ingen bekreftede rapporter over øyeblikkelige eller forsinkede allergiske reaksjoner til tross for betydelig human oral-, dermal- og inhalasjonseksposering. Laboratoriestudier med pattedyr indikerer heller ingen potensielle allergiske reaksjoner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

Monsanto har utført undersøkelser for allergenitet ved å sammenligne Cry-proteinenes aminosyresekvens til allergene proteiner. Det er ikke påvist store strukturelle likheter til allergene proteiner. Cry-proteinene er undersøkt for stabilitet i simulerte mage-tarmsafter. I simulert magesaft kataboliseres begge proteinene hurtig. De er brutt ned i løpet av 30 sekunder. Undersøkelser med tarmsaft viser at den alkalie-stabile delen av cry-proteinene er stabil i tarmsaft mer enn 24 timer.

Adjuvans

Det har ikke vært utført immunologiske studier med de transgene produktene. Det er vist at Cry1Ac-proteinet 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-proteinet som er benyttet i disse studiene, tilsvarer Cry2Ab2- og Cry3Bb1-toksinene som den transgene maislinjen lager. Domene II fra 1Ab og 1Ac er til stede i Cry1A.105, se figur. 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 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 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 er mulig at Cry2Ab2- og Cry3Bb1-proteinene som benyttes i MON 89034 x MON 88017, kan ha tilsvarende effekter som vist for det beslektede Cry1Ac-proteinet. Cry1A.105 inneholder domene II fra Cry1Ac-proteinet og det er mulighet for at Cry1A.105 har tilsvarende effekt som Cry1Ac-proteinet, som induserer immunologiske reaksjoner mot seg selv og økt reaksjon mot proteiner gitt samtidig. Dersom Cry1A.105, Cry2Ab2 og Cry3Bb1 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 har vært dyrket og konsumert siden 1996.

4.3. Delkonklusjon:

Faggruppen finner det ut fra tilgjengelige data vanskelig å vurdere om korn fra MON 89034 x MON 88017 er mer allergifremkallende enn umodifiserte maiskorn. På bakgrunn av foreliggende eksperimentelle studier i mus, finner Faggruppen imidlertid at muligheten for økt allergifremkallende aktivitet hos MON 89034 x MON 88017 med den informasjon vi har tilgang til, ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes. Da mengde Cry1A.105, Cry2Ab og Cry3Bb1-proteiner i maiskorn kan til sammen være opp til 11µg/g tørr vekt, mener Faggruppen at det må kreves av Monsanto å kommentere forsøkene som viser adjuvanseffekt av Cry1Ac.

5. Miljørisikovurdering

Maishybriden MON 89034 x MON 88017 er dannet ved konvensjonelle krysninger mellom to innavlede linjer, avledet av maislinjene MON 89034 og MON 88017. Foreldrelinjen MON 89034 inneholder de bakterielle genene *cry1A.105* og *cry2Ab2*, som koder for δ -endotoksiner som gir resistens mot enkelte arter i ordenen *Lepidoptera*. *Cry1A.105*-toksinet gir maisplantene toleranse mot larver av bla *Spodoptera* sp. (fall armyworm), *Ostrinia nubilalis* (europeisk maispyralide) og *Agrotis ipsilon* (stort jordfly), mens *Cry2Ab2* gir toleranse mot *Helicoverpa zea* (corn earworm). Den innsatte genkonstruksjonen i foreldrelinje MON 88017 inneholder genene *cry3Bb1* og *cp4-epsps*genet, som gir plantene toleranse mot angrep fra arter i familien bladbiller (*Chrysomelidae*) (*Diabrotica* ssp), og herbicider med virkestoffet glyfosat.

Monsantos søknad om godkjenning av hybridlinjen MON 89034 x MON 88017 under forordning 1829/2003/EF omfatter bruksområdene næringsmidler, fôrvarer, import og prosessering. Søknaden gjelder ikke dyrking. Miljørisikovurderingen av den transgene maislinjen er derfor avgrenset til mulige effekter av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport og prosessering til mat, fôr og industrielle formål. I tillegg vil indirekte eksponering gjennom gjødsel fra husdyr fôret med genmodifisert mais representere en mulig kilde til uønsket genspredning.

5.1. Potensiale for ikke intenderte effekter på fitness relatert til genmodifiseringen

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

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

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

Spredning av mais til andre habitater i Europa er hovedsakelig begrenset av dårlig konkurransevne, manglende frøkvile, mottagelighet for sjukdom og liten toleranse for lave temperaturer. Det er ikke påvist forskjeller mellom den insektresistente maislinjen og konvensjonelle sorter med tilsvarende genetisk bakgrunn for disse karakterene, og det er det ikke grunn til å anta at den introduserte egenskapen hos MON 89034 x MON 88017 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 2005).

Ut fra dagens vitenskapelig innsikt mht barrierer for genoverføring mellom ubeslektede arter og flere års forskning for om mulig å framprovosere tilfeldig overføring av genetisk materiale fra planter til mikroorganismer, dyr eller mennesker gjennom inntak eller eksponering, er det ingenting som tyder på at transgenene i MON 89034 x MON 88017 skal kunne overføres til andre enn naturens kryssingspartnere dvs. annen dyrket mais i Europa. Det er blant annet 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 føring. 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 og Wackernagel (2002) har undersøkt persistens av DNA og opptak av GM DNA i jord. I disse laboratorieforsøkene ble det detektert svært små mengder DNA som var overført fra planter til bakterier. Forutsetningen for at dette kunne skje var sekvenshomologi mellom plantetransgenet og mottagerbakterien.

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 MON 89034 x MON 88017 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 MON 89034 x MON 88017.

5.2.2. Vertikal genoverføring

Potensialet for krysspollinering mellom MON 89034 x MON 88017 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

Maislinjen MON 89034 er transformert med genene *cry1A.105* og *cry2Ab2* fra jordbakterien *Bacillus thuringiensis*. Proteinene som uttrykkes gir plantene resistens mot angrep fra enkelte arter i ordenen *Lepidoptera*, eksempelvis *Spodoptera* sp. (fall armyworm), *Ostrinia nubilalis* (europesk

maispyralide), *Agrotis ipsilon* (stort jordfly) og *Helicoverpa zea* (corn earworm). Det er rapportert om enkeltfunn av maispyralide i Vestfold, Telemark og Agder (<http://nhm.uio.no/norlep/>). Stort jordfly opptrer av og til som skadegjører i rotvekster i Norge, og er en mulig skadegjører i mais (Meadow 2007). Den innsatte genkonstruksjonen i foreldrelinje MON 88017 inneholder genet *cry3Bb1* og som gir plantene toleranse mot angrep fra arter i familien bladbiller (*Chrysomelidae*) (*Diabrotica* ssp). *Diabrotica virgifera virgifera* ('Western corn rootworm') er det eneste målinsektet som er påvist i Europa (Crop Protection Compendium 2007).

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

5.4. Potensiale for samspill mellom GMP og ikke-målorganismer

Sporadiske spillplanter av MON 89034 x MON 88017 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-toksinet denatureres av enzymaktivitet (proteaser) i fordøyelseskanalen, og mikrobielle prosesser vil føre til en ytterligere nedbryting av proteinet i gjødsla. Dette medfører at svært lite Cry-proteiner blir spredt med husdyrgjødsel på dyrket mark, som igjen minimerer faren for eksponering av potensielt sensitive ikke-målorganismer. Spredning av Cry-toksiner via gjødsel antas derfor ikke å gi signifikante miljøeffekter.

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

Ved foreskrevne bruk av maislinjen MON 89034 x MON 88017 vil eksponeringsnivået av Cry-proteiner være svært lavt, og ikke medføre signifikante effekter på abiotisk miljø og biokjemiske prosesser.

5.6. Delkonklusjon

Søknaden gjelder godkjenning av maislinjen MON 89034 x MON 88017 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 foreskrevne bruk av maislinjen MON 89034 x MON 88017 antas det ikke å være risiko for negative effekter på målorganismer, ikke-målorganismer eller på abiotisk miljø i Norge.

KONKLUSJON

Det er funnet statistiske forskjeller i enkeltparametere, men verdiene for de enkelte analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen. Faggruppen anser det for lite trolig at disse forskjellene har noen helsemessig konsekvens, og konkluderer med at det ikke er grunn til å anta at den ernæringsmessige kvaliteten til den genmodifiserte maisen MON 89034 x MON 88017 er forskjellig fra umodifisert mais.

Flere studier viser at proteinene Cry1A.105, Cry2Ab2 og Cry3Bb1 ikke er akutt toksiske. Monsanto har ikke utført sub-kroniske studier på rotter med MON 89034 x MON 88017. Faggruppen konkluderer med at det er lite sannsynlig at eksponering for proteinet i seg selv og i de mengder som tilføres via genmodifisert mais, er helsemessig betenkelig.

Faggruppen mener at det må kreves av Monsanto å kommentere de forsøk som gjort der det er påvist adjuvanseffekter av Cry1Ac og om slike effekter kan oppstå ved inntak av maisprodukter som inneholder aktivt Cry1A.105, Cry2Ab2 og Cry3Bb1-protein.

Søknaden gjelder godkjenning av maislinjen MON 89034 x MON 88017 for import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av maislinjen. Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av maislinjen i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Risiko for utkryssing med dyrkede sorter vurderes til å være ubetydelig. Ved foreskrevne bruk av MON 89034 x MON 88017 antas det ikke å være risiko for negative effekter på målorganismer, ikke-målorganismer eller på abiotisk miljø i Norge.

Samlet vurdering

Faggruppen finner det lite trolig at bruk av maislinjen MON 89034 x MON 88017 vil medføre endret risiko for helse og miljø i forhold til annen mais, men påpeker kunnskapshull knyttet til om Cry-proteinene i MON 89034 x MON 88017 kan virke som adjuvant.

REFERANSER

- de Vries J & Wackernagel W (2002) Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(4):2094-2099.
- EFSA (2004) Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. *The EFSA Journal* 48: 1-18. http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_opinions/384.html
- EFSA (2006) Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. 100 s. http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_guidance/660.html
- EHC (1999) Environmental Health Criteria 217. *Bacillus thuringiensis*. WHO, Geneva 1999.
- EPA (2003) Event MON863 *Bt* Cry3Bb1 Corn Biopesticide Registration Action Document.
- Guerrero GG, Russell WM, Moreno-Fierros L (2007) Analysis of the cellular immune response induced by *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins in mice: Effect of the hydrophobic motif from diphtheria toxin. *Mol Immun* 44:1209–1217.
- Hallauer AR (2000) Potential for outcrossing and weediness of genetically modified insect protected corn. APHIS-USDA.
- Lid J & Lid DT (2005) Norsk flora. Det Norske Samlaget, Oslo. 7. utgave. 1230 s.
- Meadow R (2007) Expected effects and side effects of approval for the use of maize MON 810 on target and non-target arthropods in and around maize fields in Norway. Rapport fra Bioforsk Plantehelse. 9 s.
- Moreno-Fierros L, Ruiz-Medina EJ, Esquivel R, López-Revilla R, Piña-Cruz S (2003) Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides in mice. *Scand J Immunol.* 57: 45-55.
- Netherwood T, Martín-Orúe SM, O'Donnell AG, Gockling S, Graham J, Mathers JC & Gilbert HJ (2004) Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nat Biotechnol* 22(2):204-209.
- Nielsen KM, van Elsas JD & Smalla K (2000) Transformation of *Acinetobacter* sp. 13(pFG4deltanptII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Appl Environ Microbiol* 66: 1237-42.
- Nielsen KM (2003) An assessment of factors affecting the likelihood of horizontal transfer of recombinant plant DNA to bacterial recipients in the soil and rhizosphere. *Collection of Biosafety Reviews (Italy)*, Vol. 1. pp. 96-149.
- OECD (2002) Consensus Document on Compositional Consideration for New Varieties of Maize (*Zea Mays*): Key Food and Feed Nutrients, Anti-nutrients and Secondary Plant Metabolites, No. 6, Series on Safety of Novel Foods and Feeds.
- OECD (2003) Consensus Document on the biology of *Zea mays* subsp. *Mays* (Maize). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology (ENV/JM/MONO) No. 27:1-49.

- Prasad SSSV & Shethna YI (1975) Enhancement of immune response by the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 62: 517-521.
- Rojas-Hernández S, Rodríguez-Monroy MA, López-Revilla R, Reséndiz-Albor AA & Moreno-Fierros L (2004) Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infect Immun.*, 72:4368-4375.
- Schubbert GW, Lettmann C & Doerfler W (1994) Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice *Mol Gen Genet* 242:495-504.
- TemaNord (1998) Safety Assessment of Novel Food Plants: Chemical Analytical Approaches to the Determination of Substantial Equivalence. TemaNord 1998:591. ISBN 92-893-0263-1.
- Vazquez-Padron RI, Martinez-Gil AF, Ayra-Pardo C, Gonzalez-Cabrera J, Prieto-Samsonov DL, de la Riva GA (1998) Biochemical characterization of the third domain from *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. *Biochem Mol Biol Int.*, 45(5):1011-20.
- Vazquez RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazan L, De La Riva GA, Lopez-Revilla R (1999) *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand J Immunol.*, 49: 578-84.
- Vazquez-Padron RI, Gonzales-Cabrera J, Garcia-Tovar C, Neri-Bazan L, Lopez-Revilla R, Hernandez M, Moreno-Fierro L, de la Riva GA (2000a) Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. *kurstaki* HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. *Biochem Biophys Res Commun.*, 271:54-8.
- Vazquez-Padron RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazan L, Martinez-Gil AF, de-la-Riva GA, Lopez-Revilla R (2000b) Characterization of the mucosal and systemic immune response induced by Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice. *Braz J Med Biol Res.*, 33:147-55.
- VKM (2005) 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. 62 p.
- VKM (2007a) Uttalelse om Monsanto's genmodifiserte mais MON 88017 (EFSA/GMO/CZ/2005/27).
- VKM (2007b) Uttalelse om Monsanto's genmodifiserte mais MON 89034 (EFSA/GMO/NL/2007/37).