



Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet

27.02.08

Helse- og miljørisikovurdering av Monsanto's genmodifiserte mais NK603 x MON 810 (EFSA/GMO/UK/2004/01)

SAMMENDRAG

Vurderingen av den genmodifiserte herbicid- og insekttolerante maislinjen NK603 x MON 810 fra Monsanto (EFSA/GMO/UK/2004/01) er utført av Faggruppe for genmodifiserte organismer under Vitenskapskomiteen for mattrygghet. I forbindelse med slutføring av saksbehandling av søknad om godkjenning maishybriden til bruk i/som næringsmidler og fôrvarer i Norge, er Vitenskapskomiteen for mattrygghet blitt bedt av Direktoratet for naturforvaltning (DN) om å foreta en vitenskapelig risikovurdering av NK603 x MON 810 med hensyn på eventuelle effekter på miljø. NK603 x MON 810 ble etter oppdrag fra DN og Mattilsynet vurdert av Faggruppe for genmodifiserte organismer i 2005 og 2006. Publisering av ny, oppdatert informasjon vedrørende foreldrelinjen MON 810 gjør at Faggruppen har valgt å inkludere helseaspekter knyttet til hybridlinjen i vurderingen.

Vurdering 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. NK603 x MON 810 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 transformeringsprosessen, bruk av vektor og det transgene konstruktet, komparativ analyse av ernæringsmessig kvalitet, mineraler, kritiske toksiner, antinæringsstoffer, allergener, nye proteiner, samt agronomiske egenskaper, potensiale for ikke-intenderte effekter på fitness, genoverføring og effekter på ikke-målorganismer.

Maishybriden NK603 x MON 810 er resultat av konvensjonell kryssing mellom foreldrelinjene NK603 og MON 810. Foreldrelinjen NK603 uttrykker CP4-EPSPS-proteiner, som er resultat av introduksjon av *cp4-epsps*-genet fra jordbakterien *Agrobacterium tumefaciens*. Genet koder for enzymet 5-enolpyruvylsikat-3-fosfatsyntetase, som omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikat-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-1

fosfonometylglycin (glyfosat). De transgene plantene vil derfor tolerere høyere doser av herbicider med virkestoff glyfosat sammenlignet med konkurrerende ugras. Foreldrelinjen MON 810 inneholder det bakterielle genet *cryIAb*. Genet koder for et δ -endotoksin som gir resistens mot enkelte skadeinsekter i ordenen *Lepidoptera*.

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 NK603 x MON 810 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 det uttrykte toksinet CRY1Ab kan ha adjuvanseffekter.

Faggruppen finner det vanskelig å vurdere om næringsmidler og fôrvarer fra maisen NK603 x MON 810 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 NK603 x MON 810 i forhold til umodifisert mais med den informasjon vi har tilgang til, ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes. Da mengde CRY1Ab i maiskorn totalt kan være 1 $\mu\text{g/g}$ tørrvekt, mener Faggruppen at det må kreves av Monsanto å kommentere forsøkene som viser adjuvanseffekt av det beslektede CRY1Ac.

Søknaden gjelder godkjenning av maislinjen NK603 x MON 810 for import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av maislinjen. Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av maislinjen i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Risiko for utkryssing med dyrkede sorter vurderes til å være ubetydelig. Ved foreskrevet bruk av maislinjen NK603 x MON 810 antas det ikke å være risiko for negative effekter på målorganismer, ikke-målorganismer eller på abiotisk miljø i Norge.

Faggruppen finner det lite trolig at bruk av maislinjen NK603 x MON 810 vil medføre endret risiko for helse og miljø i forhold til annen mais, men påpeker kunnskapshull knyttet til om CRY-proteinet i NK603 x MON 810 kan virke som adjuvant.

NØKKELORD

Genmodifisert mais, NK603 x MON810, insektsresistens, CRY1Ab, CP4 EPSPS- enzym, helsemessig trygghet, helse, miljørisiko

INNHOLDSFORTEGNELSE

SAMMENDRAG	1
BAKGRUNN	4
OPPDRAK FRA MATTILSYNET OG DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING.....	5
RISIKOVURDERING	6
KONKLUSJON	18
REFERANSER	20
VEDLEGG	23

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 Opsahl Sorteberg, Odd E. Stabbetorp, Vibeke Thrane,

Koordinatorer fra sekretariatet: Arne Mikalsen og Merethe Aasmo Finne

BAKGRUNN

Faggruppe for genmodifiserte organismer under Vitenskapskomiteen for mattrygghet er blitt bedt av Direktoratet for naturforvaltning om å foreta en vitenskapelig vurdering av miljørisiko i forbindelse med nasjonal sluttbehandling av søknad om godkjenning av den genmodifiserte maishybriden NK603 x MON 810 fra Monsanto (EFSA/GMO/UK/2004/01). NK603 x MON 810 er godkjent for omsetning i EU/EØS-området under forordning (EF) Nr. 1829/2003. Godkjenningen omfatter bruk av maislinjen i/som næringsmidler og fôrvarer, og gjelder ikke dyrking.

Søknad om markedsføring av den genmodifiserte maishybriden ble fremmet og anbefalt av britiske myndigheter i juni 2004. Etter en 90-dagers høringsperiode til EU/EØS-landene, leverte EUs vitenskapskomité (EFSA) sin uttalelse i oktober 2005 (EFSA 2005). Endelig godkjenning av søknaden ble gitt 24. oktober 2007 (Kommisjonsbeslutning 2007/701/EC). Maislinjen NK603 x MON 810 er også søkt omsatt under EUs utsetningsdirektiv 2001/18/EF. Søknaden omfatter alle bruksområder, inkludert dyrking og er nå overført til forordning 1829/2003/EF (<http://www.gmo-compass.org>).

Foreldrelinjene NK603 og MON 810 er tidligere godkjent for import, videreprosessering, mat og fôr under henholdsvis direktiv 2001/18/EF og direktiv 90/220/EF. Godkjenningen for MON 810 omfatter også dyrking, mens NK603 er søkt godkjent for dyrking. Begge foreldrelinjene er i tillegg godkjent under Novel Foodsforordningen (EF) Nr. 258/97, og notifisert som eksisterende produkter under forordning 1829/2003/EF. Godkjenningen av MON 810 gikk ut i april 2007, og Monsanto har søkt om fornyet godkjenning fram til 2017. Dossieret til søknaden (EFSA-GMO-RX-MON 810) om mat, fôr, import, prosessering og dyrking er lagt ut på EFSA-net.

Utenfor EU/EØS-området er maishybriden NK603 x MON 810 godkjent for dyrking, og/eller omsetning som mat/fôr i Argentina, Japan, Filippinene, Mexico, Korea og Sør-Afrika (vedlegg 1). Oversikt over notifiseringer av foreldrelinjene er presentert i vedlegg 2 og 3.

Faggruppe for genmodifiserte organismer har tidligere foretatt en vurdering av både foreldrelinjene og hybrid NK603 x MON 810 med hensyn på eventuelle helseeffekter ved bruk som mat og fôr (VKM 2005a; 2007a). Faggruppen har også levert en miljørisikovurdering av MON 810 for alle bruksområder (VKM 2007b).

OPPDRAK FRA DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING

I forbindelse med slutføring av saksbehandling av søknad EFSA/GMO/UK/2004/01, genmodifisert maishybrid NK603 x MON 810 fra Monsanto, har Direktoratet for naturforvaltning i brev datert 4.1.2008 (ref. 2005/6313 ART-BM-EBI) bedt Vitenskapskomiteen for mattrygghet om å foreta en vitenskapelig risikovurdering av maislinjen med hensyn på eventuelle effekter på miljø. Bakgrunnen for oppdraget er at Norge i forbindelse med implementering av EUs regelverk på genmodifisert mat og fôr, må ta endelig stilling til om søknaden skal innvilges også her i landet. Publisering av ny, oppdatert informasjon vedrørende foreldrelinjen MON 810 gjør at Faggruppen har valgt å inkludere helseaspekter knyttet til hybridlinjen i vurderingen.

Faggruppe for genmodifiserte organismer skal vurdere søknaden om markedsføring av maishybriden til bruk i/som næringsmidler og fôrvarer under forordning 1829/2003/EF. Oppdraget omfatter forhold knyttet til miljørisiko som gjelder for alle land som omfattes av godkjenningen (EØS-området), og på miljørisiko som vil være spesielt viktige for Norge. Det skal også gis en samlet konklusjon om miljørisiko i tråd med kravene i forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven, vedlegg 2C.

Produktet som ønskes vurdert:

Genmodifisert mais, EFSA/GMO/UK/2004/01 (NK603 x MON 810).

Unik kode: MON-ØØ6Ø3-6 x MON-ØØ81Ø-6.

Status i EU: Søknad er vurdert og godkjent under forordning (EF) Nr. 1829/2003.

Ønsket svarfrist til DN: 19. februar 2008.

RISIKOVURDERING

1. Innledning

Risikovurderingen av den transgene maishybriden NK603 x MON 810 er i hovedsak basert på dokumentasjon fra EFSA som er relatert til søknadene om godkjenning av maishybridene NK603 x MON 810 og MON 88017 x MON 810 (EFSA/GMO/UK/2004/01; EFSA/GMO/CZ/2006/33). Denne informasjonen er tilgjengelig på EFSAAs nettside GMO EFSA-net. I tillegg er det benyttet uavhengige vitenskapelige publikasjoner med referee i vurderingen. Vurderingen er gjort 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.

Faggruppe for genmodifiserte organismer har på faggruppemøtet 2.2.2005 vedtatt å bruke EFSAAs retningslinjer som retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter. Prinsippene som er lagt til grunn for vurderingen er derfor hentet fra EFSAAs dokument "Guidance document of the scientific panel on genetically organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed" (EFSA 2006). Ved vurdering av vesentlig likhet har Faggruppen lagt vekt på OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002), som gir anbefalinger over hvilke parametere som bør undersøkes.

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. EFSAAs vurdering av maishybriden NK603 x MON 810 ble publisert 13. oktober 2005 (EFSA 2005).

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

1.1. Beskrivelse av egenskaper(er) og virkningsmekanismer

Hybriden NK603 x MON 810 er dannet ved tradisjonell kryssingsforedling mellom avkom av de genmodifiserte maislinjene MON 810 og NK603.

Foreldrelinjen MON 810 har fått innsatt det bakterielle genet *cry1Ab*. Genet er isolert fra *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1. *Cry1Ab*-genet koder for δ -endotoksiner som gir plantene toleranse mot enkelte arter i ordenen *Lepidoptera*, eksempelvis *Ostrinia nubilalis* (maispupalide) og arter i slekten *Sesamia* (nattflyfamilien, *Noctuidae*).

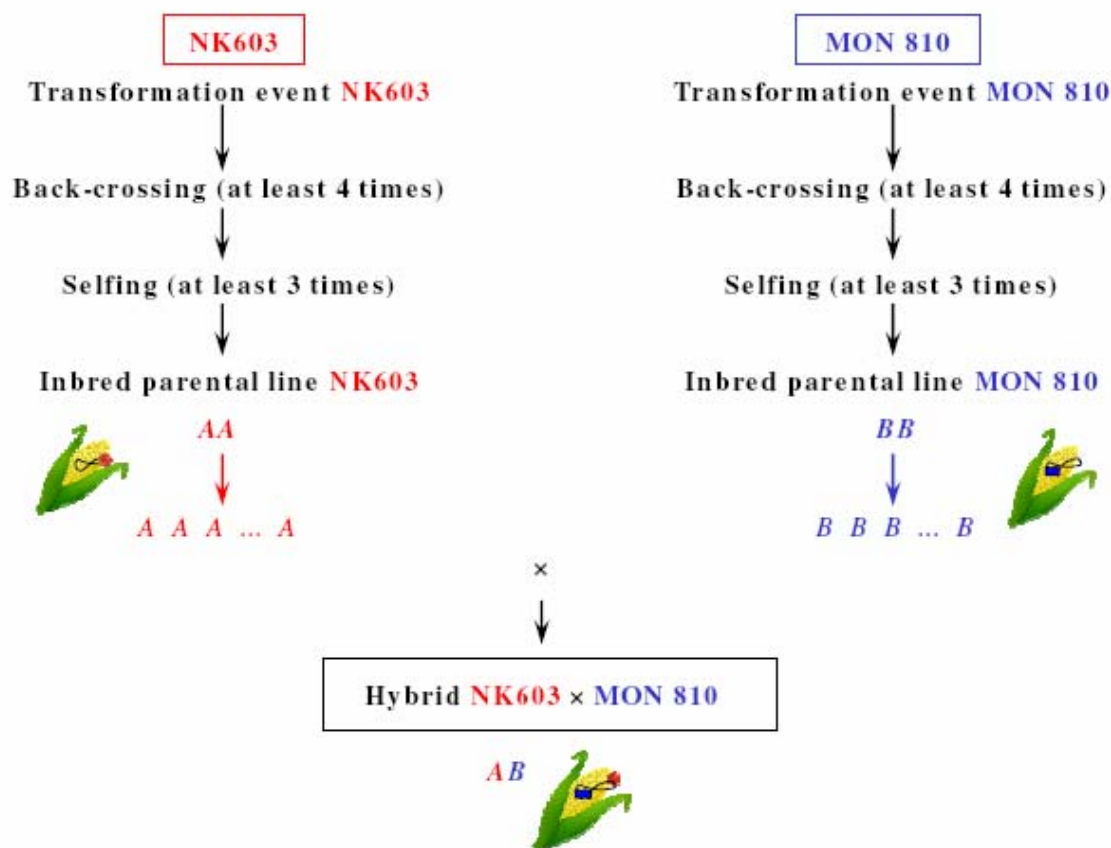
Foreldrelinjen NK603 er transformert med genet *cp4-epsps* fra bakterien *Agrobacterium tumefaciens*. Genet koder for enzymet 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfatsyntetasen (CP4 EPSPS), som omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfat, en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske 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 NK603 x MON 810 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom maislinjene MON 810 og NK603.

Figure 1. Typical traditional breeding strategy for NK603 x MON 810



Figur 1. Kryssingsskjema for hybriden NK603 x MON 810.

2.2. Evaluering av foreldrelinjer

2.2.1. Maislinje MON 810

Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

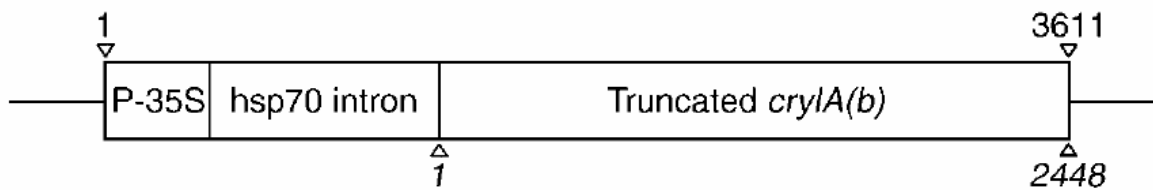
Cry1Ab-ekspressjonskassetten inneholder *e35s*-promoter fra blomkålmosaikkvirus (CaMV), intronet *hsp70* fra mais og et trunkert *cry1Ab*-gen og finnes i én kopi i genomet. *Cry1Ab*-genet stammer fra jordbakterien *Bacillus thuringiensis*. DNA-fragmentet som stammer fra plasmidet PV-ZMBK07 ble overført til embryomaisceller med partikkelaksellerasjonsmetoden. DNA-fragmentet inneholder ikke antibiotika-resistensgen. Transformanter ble selektert ved at de overlevde og vokste i nærvær av glyfosat.

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 følgende gener og DNA elementer (se figur 2):

Cry1Ab ekspresjonskassett

- a) *e35S* promoter med dobbel enhancer, fra blomkålmosaikkvirus(*CaMV*)
- b) *Zmhsp 70* det første intronet i "heat shock" protein-70 genen for å øke transkripsjonen og dermed nivået av gentranskriptet, stammer fra mais
- c) *Cry1Ab* gen som koder et syntetisk Cry1Ab- protein, fra *Bacillus thuringiensis*



Figur 2. Rekombinant DNA fragment i maisens genom.

Karakterisering av geninnsettingen

Molekylærbiologiske analyser viser at det rekombinante fragmentet i planten inneholder et trunkert *cry1Ab* gen, en trunkert *e35S* promoter og et fullengde *hsp70* intron (figur 2). CRY1Ab- proteinet som uttrykkes i maiskorn er undersøkt med Western-blot analyse og densitometri, SDS-PAGE, densitometri, trypsinbehandling av proteinet og Southern blot.

PCR- og sekvenseringsanalyser av det rekombinante DNA fragmentet i MON 810 viser at fragmentet er på 3582 nukleotider (bp). Analysene viser at det trunkerte *cry1Ab*-genet er på 2448 bp og *e35S* promoteren er 307 bp, mens *hsp70* intronet er uendret. *Cry1Ab* genet i plasmidet PV-ZMBK07 er ca. 3471 bp og *e35S* promoteren er 621 bp. Det er foretatt en rekke sekvenseringsanalyser av flankesekvensene til det rekombinante DNA fragmentet (Borovkov *et al* (2001), Holck *et al* (2002), Hernández *et al* (2003), Scanlon *et al* (2007)). Borovkov *et al* (2001), Hernández *et al* (2003) og Scanlon *et al* (2007) har sekvensert henholdsvis ca. 606 bp, ca. 560 bp og ca. 1265 bp nedstrøms fra 3'-flanke-ende til det rekombinante DNA fragmentet. Det er ikke funnet sekvenser som har likheter med kjente maisgener. For sekvenseringsanalysene oppstrøms fra 5'-flankesekvenser henviser Monsanto til Borovkov *et al* (2001) og Holck *et al* (2002). Sekvensering og BLAST til maisgenomsekvenser støtter antagelsen av at det har skjedd en rekombinasjon mellom transgen og flankesekvensene i MON 810, som kan forklare hvorfor mye av plasmidvektor DNAet er fjernet og en har fått satt sammen nye deler av maismorlinjens kromosomfragment etter genmodifiseringen av MON 810. Holck *et al* har sekvensert 803 bp av flankesekvensene, og analysene viser at flankesekvensene er genomisk DNA fra mais. Nyere karakterisering av det rekombinante DNA fragmentet i MON 810 og sekvenseringsanalyser av flankerende sekvenser er utført i 2007 (Scanlon *et al* 2007).

Informasjon vedrørende uttrykk av gener som er satt inn i maisgenomet, åpne leserammer (ORF) og uttrykk av mulige fusjonsproteiner

Mengde CRY1Ab- protein i korn er målt til henholdsvis $0,72 \pm 0,21$ µg/g ferskvekt (variasjonsbredde = 0,38 – 1,1) og $6,4 \pm 2,62$ µg/g tørrvekt (variasjonsbredde = 1,99 – 9,91) i korn og furasje. Prøvene som er analysert stammer fra tre feltforsøk utført i Frankrike i 2000. Det er tatt ut fire prøver fra hvert feltforsøk. Monsanto henviser til feltforsøk utført i USA i 1994 (6 steder) og 1995 (5 steder) samt i EU i 1995 (4 steder) og 1996 (3 steder). Mengde CRY1Ab-protein i korn for disse forsøkene er henholdsvis: $0,31 \pm 0,09$ µg/g ferskvekt (variasjonsbredde = 0,19 – 0,39), $0,57 \pm 0,21$ µg/g ferskvekt.

(variasjonsbredde = 0,39 – 0,91), $0,53 \pm 0,12$ µg/g ferskvekt (variasjonsbredde = 0,42 – 0,69) og $0,41 \pm 0,06$ µg/g ferskvekt (variasjonsbredde = 0,35 – 0,46), samt i furasje er henholdsvis $4,15 \pm 0,71$ µg/g ferskvekt (variasjonsbredde = 3,65 – 4,65), $3,34 \pm 1,09$ µg/g ferskvekt (variasjonsbredde = 2,31 – 4,48), $4,80 \pm 0,75$ µg/g ferskvekt (variasjonsbredde = 4,11 – 5,56) og $4,88 \pm 0,52$ µg/g ferskvekt (variasjonsbredde = 4,32 – 5,34).

Teoretiske analyser av mulige polypeptider fra hver leseramme v.h.a. allergen(AD4 (5')/UPDATE2 (3'))-, toksin(TOXIN5(5') og Toxin4 (3'))- og peptid (ALLPEPTIDES (5' og 3'))-databaser er utført. Sekvenser som flankerer 5' viser i henhold til Monsanto ingen strukturelle likheter til allergener, toksiner og farmakologiske aktive proteiner. Imidlertid viser sekvenseringsanalyser utført av Holck *et al* (2002) stor likhet til genklusteret *α-zein* som sitter i maiskromosom 4. Det er ikke funnet andre sekvenser som har likheter med kjente maisgener. 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. Sekvenser som flankerer 3' viser i henhold til Monsanto ingen strukturelle likheter til allergener, toksiner og farmakologiske aktive proteiner. Det er imidlertid funnet sekvenslikhet til proteinet importin *α*. Monsanto hevder at om et kimært peptid dannes vil ikke dette være skadelig for mennesker eller dyr, fordi 90 dagers føringstudie på rotter viser ingen forskjeller mellom MON 810 og umodifisert mais.

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

Nedarving og stabilitet av den innsatte genkonstruksjonen er vist både via spaltingsdata og ved Southern analyse. Spaltingsdata fra 7 tilbakekryssinger av MON 810 til en av foreldrelinjene, og 6 tilbakekryssinger til en ubeslektet, innavlet linje er brukt til å evaluere genetisk stabilitet. Data som presenteres er i overensstemmelse med forventede spaltingstall. I følge søker viser også resultater fra Southern analyse at det innsatte transgenet er stabilt og sitter som i opprinnelig transformasjon på samme kromosom og i samme integreringssete i maisens genom.

Delkonklusjon

Faggruppen har tidligere vurdert de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av proteinene og funnet at informasjonen er tilstrekkelig. Faggruppen konkluderer med at karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i MON 810 er tilfredsstillende.

2.2.2. Maislinje NK603

Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

Den genmodifiserte maislinjen NK603 uttrykker glyfosattoleranse pga et bakterie 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfat syntetase enzym som uttrykkes av *cp4-epsps*-genet. 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 på 6706 basepar fra PV-ZMGT32 plasmidet inneholder to ekspresjonskassetter med et enkelt *cp4-epsps*-gen i hver kassett. Den første kassetten inneholder en aktinpromoter og et intron (r-act P+I) fra ris, et optimalisert kloroplast overføringspeptid (CTP2), og en nopalinsyntase 3'-ende terminatorsekvens (NOS3'). Den andre ekspresjonskassetten inneholder en e35S-promoter, et ZmHSP70 intron *cp4-epsps* gen og en nopalinsyntase 3'-ende terminatorsekvens (NOS3'). 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.

Beskrivelse av de innsatte genene

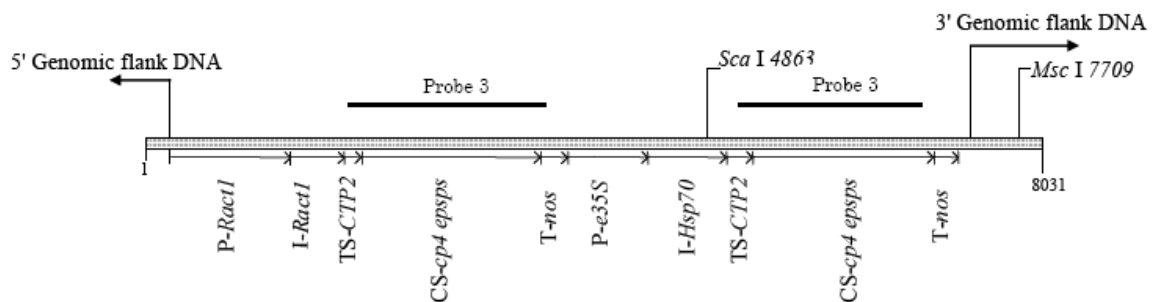
Southern blot og PCR har blitt brukt for å karakterisere det rekombinante DNA-fragmentet i planten. De molekylærbioologiske karakteriseringen viser at det er satt inn et rekombinant DNA-fragment i NK603 åkermais. Dette fragmentet inneholder:

Cp4epsps genkasset

- a) *P-Ract1/I-Ract1* Actingenets promoter og intron fra ris (1,4 kb)
- b) *TS-CTP2* *Arabidopsis thaliana* targeting sekvens (0,2 kb)
- c) *CS-cp4epsps* Gensekvensen *5 enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase* fra *Agrobacterium tumefaciens* stamme CP4 (1,4 kb)
- d) *T-Nos* Transkripsjonstermineringssekvens fra *Agrobacterium tumefaciens* (0,3 kb)

Cp4epspsL214p genkasset

- a) *P-e35S* Blomkålmosaikkvirus promoter (0,6 kb)
- b) *I-Hsp70* Heatshockprotein 70 promoter fra mais (0,8 kb)
- c) *TS-CTP2* *Arabidopsis thaliana* targeting sekvens (0,2 kb)
- d) *CS-cp4epspsL214p* Gensekvensen *epsps* fra *Agrobacterium tumefaciens* stamme CP4 (1,4 kb)
- e) *T-Nos* Transkripsjonstermineringssekvens fra *Agrobacterium tumefaciens* (0,3 kb)



Figur 3. Rekombinant DNA fragment fra mais-NK603 som er integrert i NK603 x MON 810- genomet.

Karakterisering av geninnsettingen

Molekylærbiologisk analyse av NK603 viser at det rekombinante fragmentet i planten inneholder de samme gener og genelementer som er på det tilsvarende fragmentet i bakterien. Genene på det rekombinante DNA-fragmentet i NK603 åkermais uttrykker EPSPS-protein som er identisk (med unntak av en aminosyre) med proteinet som uttrykkes i bakterien.

Ved revers transkriptase PCR (RT PCR) ble det påvist et transkripsjonsprodukt som startet inne i det rekombinante fragmentet. Transkripsjonen gikk gjennom NOS-terminatoren og inn i maisgenomets flankerende 3' område. To eller flere mRNA molekyler ble dannet, ett på 1,4 kb (antatt å være *cp4-epsps L214P* transkriptet) og 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.

Flankerende sekvenser til det rekombinante DNA-fragmentet i planten er analysert, 300 bp oppstrøms og 500 bp nedstrøms. Sammenlignende analyse med foreldrelinjen LH82xB73 viste at de flankerende sekvensene til NK603s DNA-fragment stammer fra foreldrelinjen.

Strukturell og funksjonell likhet mellom CP4 EPSPS og CP4 EPSPSL214P 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 proteinet 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. Mengde CP4-EPSPS i korn er anslått til 0,01 % av den totale proteinmengden.

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

Krysning over seks generasjoner og tre selvpollineringsgenerasjon viser at det rekombinante EPSPS-fragmentet er stabilt inkorporert i maisgenomet.

Delkonklusjon

Faggruppen har tidligere vurdert de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av CP4 EPSPS proteinet og funnet at informasjonen er tilstrekkelig (VKM 2005 a). Faggruppen konkluderer med at karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i NK603 er tilfredsstillende.

2.2.3. Hybriden NK603 x MON 810

NK603 x MON 810 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom MON 810 og NK603.

Molekylær karakterisering

Det er foretatt Southern blot-analyse for å undersøke tilstedeværelsen og antall kopier av MON 810- og NK603-ekspresjonskassetten i NK603 x MON 810. Det er påvist en enkel kopi av henholdsvis MON 810- og NK603-ekspresjonskassetten. Monsanto hevder at andre molekylærbiologiske analyser ikke er nødvendig fordi det er liten sannsynlighet for molekylær gjensidig påvirkning mellom innskuddene fra MON 810 og NK603 i NK603 x MON 810 fordi de to ekspresjonskassetten ligger på hvert sitt kromosom, henholdsvis kromosomene 8 og 6. Det konkluderes med at det er kun én kopi av ekspresjonskassetten fra henholdsvis NK603 og MON 810. Sammenlignende Southern blot-analyser mellom hybriden NK603 x MON 810 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.

Informasjon om uttrykk av introduserte gener

Mengde CRY1Ab protein i furasje og korn er målt til henholdsvis 6,06 µg/g ± 1,87 fersksvekt (variasjonsbredde=2,76-8,80) og 0,73 ± 0,14 µg/g fersksvekt (variasjonsbredde=0,53-0,98). Mengde CP4-EPSPS protein i furasje og korn er målt til henholdsvis 36,3 ± 16,7 µg/g fersksvekt (variasjonsbredde=12,6-61,4) og 12,7 ± 6,8 µg/g fersksvekt (variasjonsbredde=2,0-21,9). Prøvene som er analysert stammer fra tre feltforsøk utført i Frankrike i 2000. Det er tatt ut fire prøver fra hvert feltforsøk.

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

Søker viser til spaltingsdata fra kryssinger over flere generasjoner med foreldrelinjene NK603 og MON 810, og resultater fra en kryssingsgenerasjon med hybriden for å demonstrere genetisk stabilitet. Videre viser Southern analyser av de rekombinante innskuddene er stabilt inkorporerte i maisgenomet.

3. Komparative analyser

3.1. Analyser av ernæringsmessige komponenter

Analyser av sammensetning i maiskorn fra maislinjen NK603 x MON 810 stammer fra fem feltforsøk utført i Argentina i sesongen 2004-2005. Det er tatt ut prøver fra tre blokker fra hvert felt. Analysene omfatter også en umodifisert kontrollhybrid (LH198 × LH172) og femten forskjellige umodifiserte kommersielle referansemahybrider.

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 enkeltparametere 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 NK603 x MON 810 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, karbohydrater, ADF, NDF, total fiber, karbohydrater, vann, 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). Femten komponenter ble ekskludert fra statistisk analyse fordi >50 % av observasjonene var ved eller lavere enn kvantifiseringsgrensen. Det er funnet 56 signifikante statistiske forskjeller ($p < 0,05$) av 236 statistiske sammenligninger. For 55 av disse signifikante forskjellene ligger verdiene innenfor 99 % toleranseintervall, eller der hvor slik intervall ikke var tilgjengelig for kontrollhybriden, innenfor 99 % av toleranseintervallet for de fem umodifiserte kommersielle referansehybridene som ble benyttet i denne studien. For den komponenten (fosfor) som det ble funnet statistisk forskjell, ble det funnet statistisk forskjell i ett av feltforsøkene, men ikke for de to andre. Monsanto har for MON 810 og NK603 ikke foretatt sammenlignende statistiske analyser med NK603 x MON 810.

Fettsyresammensetning i maiskorn

Fettsyresammensetningen for NK603 x MON 810 er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Det ble analysert for 22 fettsyrer. Av disse ble 14 ekskludert fra statistiske analyser fordi over 50 % av de analyserte mengdene var lavere enn deteksjonsgrensene. Forskjellen var lavere enn 10 % og alle verdiene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen.

Aminosyrer i maiskorn

Både essensielle og ikke-essensielle aminosyrer ble analysert. Det er funnet statistiske forskjeller for en aminosyre i ett av de fem forsøksfeltene. Verdien ligger innenfor et område på 20 %. For alle aminosyrene ligger verdiene innenfor de typiske verdiene 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. Vitamin E ble ekskludert fra de statistiske analysene fordi over 50 % av de analyserte mengdene var lavere enn deteksjonsgrensen. Følgende vitaminer er ikke målt: vitamin A, niacin og vitamin C. For de fleste vitaminene som er målt ligger de statistiske forskjellene innenfor ± 20 %, og 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 fosfor er det innenfor ett av de fem forsøksfeltene forskjeller på ca. 3-23 %. Verdiene for alle mineralene ligger innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen.

Sekundære metabolitter og antiernæringsstoffer

Det er ikke funnet statistiske forskjeller for sekundære metabolitter og antiernæringsstoffer. For raffinose var 39 av 108 målinger lavere enn påvisningsgrensen. Det er ikke målt for toksinene DIMBOA og MBOA.

Delkonklusjon

Det er funnet statistiske forskjeller i enkeltparametere. 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.

3.2. Agronomiske egenskaper

Søker opplyser at det er gjennomført feltforsøk med maislinjen NK603 x MON 810 på fire lokaliteter i USA i vekstsesongen 2002 (Iowa, Missouri, Nebraska og Ohio). Hvert forsøksfelt bestod av et fullstendig randomisert blokkdesign med tre gjentak. Seksten kommersielt tilgjengelige hybridsorter ble benyttet som referansemateriale i forsøkene, fire sorter på hvert forsøkssted. I tillegg ble det benyttet en ikke-transgen maislinje med tilsvarende genetisk bakgrunn som kontroll. 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. Resultatene fra varansanalysen over steder viser ingen signifikante forskjeller på 5 % nivå mellom NK603 x MON 810 og den ikke transgene kontrollinjen for de 14 registrerte fenotypiske karakterene. Monsanto har ikke presentert resultater fra analyser innen steder. Kombinerte analysene av karakterer knyttet til sjukdoms- og insektsresistens og abiotisk stress viste ingen signifikante forskjeller mellom testmateriale og kontroll. Forskjeller som ble påvist mellom hybridlinjene på ett av teststedene ble relatert til forskjeller i feltforhold på forsøkslokaliteten.

Monsanto viser også til at det har vært kommersiell produksjon av NK603 x MON 810-sorter i stort omfang i Nord-Amerika siden 2002, uten at det er avdekket ikke-intenderte effekter. Forsøk med foreldrelinjene MON 810 og NK603 på en rekke lokaliteter i USA og Europa heller ikke vist signifikante forskjeller i forhold til kontrollsorter med hensyn på agronomiske karakterer.

3.3. Delkonklusjon

Analysene av ernæringsmessige viktige komponenter viser statistiske forskjeller i enkeltparametre. Verdiene for de enkelte analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen. Faggruppen mener at de forskjellene som er påvist ikke har noen ernæringsmessig betydning. Med unntak for herbicidtoleranse og toleranse mot enkelte målorganismer, viser resultatene fra undersøkelsene av agronomiske og morfologiske karakterer ingen forskjeller mellom NK603 x MON 810 og kontrollsorter.

4. Dokumentasjon av toksisitet og allergenisitet

4.1. Toksisitet

Søknaden inneholder ikke dokumentasjon på føringforsøk med renfremstilt CRY1Ab- og CP4 EPSPS-proteiner. Monsanto hevder at siden resultater fra disse føringforsøkene finnes i andre av Monsanto's søknader, som NK603, MON 810, MON863 x MON 810 og GA11, er det ikke nødvendig å inkludere denne dokumentasjonen i søknaden for denne aktuelle eventen.

Føringforsøk på broiler

Søknaden inneholder dokumentasjon fra 42-dagers føringforsøk på broilere. 800 dyr, fordelt på åtte grupper ble føret med henholdsvis mais fra NK603 x MON 810, en umodifisert kontrollhybrid og fem kommersielle umodifiserte referansehybridsorter. Det ble påvist testrelaterte endringer i mengde protein i brystmuskelen for gruppene som ble føret med NK603 x MON 810, umodifisert kontrollhybrid og en av de fem kommersielle referansehybridene. For de andre målte parametrene var det ingen statistiske forskjeller ved føring med maiskorn fra NK603 x MON 810, tradisjonell kontroll og referansehybridene. Faggruppen konkluderer med at det er ingen grunn til å anta at den ernæringsmessige kvaliteten til den genmodifiserte maisen er forskjellig fra umodifisert mais.

Subkronisk føringforsøk på rotter

Monsanto hevder at det ikke er nødvendig å foreta subkroniske føringforsøk med korn fra NK603 x MON 810 fordi slike forsøkene er utført med henholdsvis MON 810 og NK603. Monsanto¹³

begrunnelse er bl.a. at ved konvensjonelle kryssinger mellom MON 810 og NK603 vil de introduserte egenskapene i maisene nedarves i hybridene. Det kombinerte uttrykket av CP4 EPSPS og CRY1Ab i NK603 x MON 810 vil ikke endre på disse proteinenes egenskaper, og de er like helsemessige trygge som i foreldrelinjene.

4.2. Allergenitet:

CP4 EPSPS L214P-protein

Det ble analysert for potensiell ekspresjon av peptider/proteiner som kan ha homologi til kjente allergener. Det ble påvist teoretisk 9 polypeptider som kan ha strukturelle homologier til allergener, toksiner og farmakologisk aktive proteiner. Ingen av disse teoretiske 9 polypeptidene ble påvist å ha strukturelle og immunologiske relevante homologier til kjente allergener. CP4 EPSPS L214P proteinet er analysert for potensiell homologi til kjente allergener. Det er ikke funnet strukturelle og immunologiske relevante homologier til kjente allergene proteiner. Den mest signifikante likheten var til støvmiddallergenet Der f II, med identitet på 30,5 % over 72 aminosyrer. Dette er lavere enn Codex sin anbefalte terskelverdi på 35 % for mulig kryssreaksjon til allergener (Codex 2003). CP4 EPSPS er testet i simulert magesaft. Proteinets degraderes fullstendig i løpet av 15 sekunder. Generelt er allergene proteiner stabile i simulert magesaft lenger enn 2 minutter. Størsteparten av allergene proteiner er vanligvis stabile i minst 60 minutter.

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 krystallprotein. Allergiske reaksjoner mot *Bacillus thuringiensis* har vært rapportert, men disse har ikke vært tilskrevet krystallprotein.

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-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, tilsvarende CRY1Ab 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 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 CRY1Ab, som benyttes i NK603 x MON 810, kan ha tilsvarende effekter som vist for det beslektede CRY1Ac-proteinet. Cry1Ab inneholder domene II fra CRY1Ac-proteinet og det er mulighet for at CRY1Ab har tilsvarende effekt som CRY1Ac-proteinet, som induserer immunologiske reaksjoner mot seg selv og økt reaksjon mot proteiner gitt samtidig. Dersom CRY1Ab 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 MON 810, som har vært dyrket og konsumert siden 1996.

4.3. Delkonklusjon

Faggruppen finner det ut fra tilgjengelige data vanskelig å vurdere om korn fra NK603 x MON 810 er mer allergifremkallende enn umodifiserte maiskorn. På bakgrunn av foreliggende eksperimentelle studier i mus, finner Faggruppen imidlertid at muligheten for økt allergifremkallende aktivitet hos NK603 x MON 810 med den informasjon vi har tilgang til, ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes. Da mengde CRY1Ab i maiskorn til sammen kan være opp til 0,73 µg/g ferskvekt, mener Faggruppen at det må kreves av Monsanto å kommentere forsøkene som viser adjuvanseffekt av CRY1Ac.

5. Miljørisikovurdering

Maishybriden NK603 x MON 810 er dannet ved konvensjonelle krysninger mellom to innavlede linjer, avledet av maislinjene MON 810 og NK603.

Foreldrelinjen MON 810 inneholder genet *cry1Ab* fra jordbakterien *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-1. Genet koder for et δ-endotoksin som gir resistens mot enkelte skadeinsekter i ordenen *Lepidoptera*, nærmere bestemt maispyralide (*Ostrinia nubilalis*) og enkelte arter i slekten *Sesamia* (nattflyfamilien). Den innsatte genkonstruksjonen i forelderlinje NK603 inneholder *cp4-epsps*-genet, som gir plantene toleranse mot herbicider med virkestoffet glyfosat.

Monsantos søknad om godkjenning av hybridlinjen NK603 x MON 810 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 stedegegne eller introduserte viltvoksende arter i den europeiske flora som mais kan hybridisere med (OECD 2003).

Spredning av mais til andre habitater i Europa er hovedsakelig begrenset av dårlig konkurransevne, manglende frøkvile, mottagelighet for sykdom og liten toleranse for lave temperaturer. Det er ikke påvist forskjeller mellom den insektresistente maislinjen og konvensjonelle sorter med tilsvarende genetisk bakgrunn for disse karakterene, og det er det ikke grunn til å anta at den introduserte egenskapen hos NK603 x MON 810 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 b).

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 NK603 x MON 810 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 fôring. Svært små mengder av M13 DNA (<0.1 %) kunne spores i blodbanene i en periode på maksimum 24 timer, mens M13 DNA ble funnet i opptil 24 timer i lever og milt (Schubbert et al. 1994). Ved oralt inntak av genmodifisert soya er det vist at DNA er mer stabilt i tarmen hos personer med utlagt tarm sammenlignet med kontrollgruppen (Netherwood et al. (2004). I kontrollgruppen ble det ikke påvist GM DNA i feces. Nielsen *et al.* (2000) og De Vries 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 NK603 x MON 810 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 NK603 x MON 810.

5.2.2. Vertikal genoverføring

Potensialet for krysspollinering mellom NK603 x MON 810 og konvensjonelt foredlete maissorter vil avhenge av omfanget av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport, håndtering og prosessering. Det er imidlertid lite sannsynlig at sporadiske enkeltplanter vil spre signifikante mengder pollen til konvensjonelle dyrkingsfelt. Dyrkingsomfanget av mais i Norge er dessuten svært begrenset. Risiko for utkryssing med dyrkede sorter vurderes derfor til å være ubetydelig.

Herbicidtoleranse 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 NK603 x MON 810 er transformert med genet *cry1Ab* fra jordbakterien *Bacillus thuringiensis*. Proteinene som uttrykkes gir plantene resistens mot angrep fra enkelte arter i ordenen *Lepidoptera*, eksempelvis *Ostrinia nubilalis* (maispupalide) og *Sesamia* ssp. I Norge er det registrert enkeltfunn av maispupalide i Vestfold, Telemark og Agder (<http://nhm.uio.no/norlep/>), men arten er ikke rapportert som skadegjører (Meadow 2007). Det er ikke gjort observasjoner av *Sesamia*-arter i Norge.

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 NK603 x MON 810 med opphav i utilsiktet frøspredning under ulike omsetningsledd antas ikke å medføre risiko for ikke-målorganismer.

Når det gjelder indirekte eksponering gjennom gjødsel fra husdyr føret med genmodifisert mais vil mesteparten av CRY- og CP4-EPSPS-proteinene 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- og CP4-EPSPS-proteiner blir spredt med husdyrgjødsel på dyrket mark, som igjen minimerer faren for eksponering av potensielt sensitive ikke-målorganismer. Spredning av CRY-toksinet og CP4-EPSPS-proteiner via gjødsel antas derfor ikke å gi signifikante miljøeffekter.

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

Ved foreskrevet bruk av maislinjen NK603 x MON 810 vil eksponeringsnivået av CRY-proteinene være svært lavt, og ikke medføre signifikante effekter på abiotisk miljø og biokjemiske prosesser.

5.6 Overvåking

I følge direktiv 2001/18/EF, annekset VII er formålet med overvåkingsplanen å bekrefte at alle antagelser i miljørisikovurderingen som gjelder forekomst og omfang av potensielle skadevirkninger av den genmodifiserte organismen, eller bruken av den er korrekt. Videre skal den identifisere

forekomsten av skadevirkninger på menneskers helse eller miljøet som skyldes den genmodifiserte organismen eller bruken av den, og som ikke ble forutsett i miljørisikovurderingen.

Overvåking er relatert til risikohåndtering og en totalvurdering av overvåkingsplanen er derfor utenfor VKMs mandat. I henhold til oppdrag fra DN, skal imidlertid VKM diskutere behovet for særskilt overvåking. Dette gjelder både i de tilfeller hvor søker ikke har foreslått særskilt overvåking og i de tilfeller hvor søkers risikovurdering avdekker behov for en spesiell overvåkingsplan. I sistnevnte tilfelle skal VKM gi en vurdering av kvaliteten på søkers overvåkingsplan, om denne er egnet til å avdekke så vel umiddelbare og direkte virkninger som forsinkede og indirekte virkninger påvist i miljørisikovurderingen. VKM skal ikke vurdere innretningen av den generelle overvåkingen.

Notifiseringen EFSA/GMO/UK/2004/01 omfatter ikke dyrking, og potensiell miljøeksponering 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. Miljørisikovurderingen som er presentert av søker identifiserer ingen endret risiko for miljø i forhold til annen mais. Monsanto har derfor ikke utarbeidet spesifikke strategier for risikohåndtering eller en særskilt plan for overvåking av denne eventen.

5.7 Delkonklusjon

Søknaden gjelder godkjenning av maislinjen NK603 x MON 810 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 NK603 x MON 810 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 Faggruppen konkluderer med at det ikke er grunn til å anta at den ernæringsmessige kvaliteten til den genmodifiserte maisen NK603 x MON 810 er forskjellig fra umodifisert mais.

Flere studier viser at proteinene CP4 EPSPS og CRY1Ab ikke er akutt toksiske. Monsanto har ikke utført sub-kroniske studier på rotter med NK603 x MON 810. Faggruppen konkluderer med at det er lite sannsynlig at eksponering for CP4 EPSPS- og CRY1Ab- proteinene 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 CRY1Ab-protein.

Søknaden gjelder godkjenning av maislinjen NK603 x MON 810 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 NK603 x MON 810 antas det ikke å være risiko for negative effekter på målorganismer, ikke-målorganismer eller på abiotisk miljø i Norge.

Samlet vurdering

Flertallet av medlemmene i Faggruppen finner det lite trolig at bruk av maislinjen NK603 x MON 810 vil medføre endret risiko for helse og miljø i forhold til annen mais, men påpeker kunnskapshull knyttet til om CRY-proteinet i NK603 x MON 810 kan virke som adjuvant.

Dissens:

Et medlem, Anne I. Myhr, mener at det er vanskelig å si noe om helseeffekter så lenge subkroniske føringsforsøk ikke er utført med maishybriden. Det er også vanskelig å si noe om toksisitet av CRY1Ab-proteinet siden det er bakterieversjonen, og ikke planteversjonen som er brukt i studier av allergisitet.

REFERANSER

- Agbios (2008) Agbios GM Database. Information on GM Approved Products.
<http://www.agbios.com/dbase.php>
- Borovkov IG, Jennings JC & Lirette RP (2001) Amended report for MSL16776: Confirmation of the genomic DNA sequence flanking the 5' and 3' ends of the insert in YieldGard corn event MON 810. Monsanto Technical Report MSL 17074.
- Codex (2003) Codex Alimentarius Commission Alinorm 03/34: Joint FAO/WHO Food Standard Programme, Codex Alimentarius Commission, Twenty-Fifth Session, Rome, Italy, June 30 – July 5, 2003. Report of the third session of the Codex ad hoc intergovernmental task force on foods derived from biotechnology. Appendix III, Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant- DNA plants, and Appendix IV, Annex of the assessment of possible allergenicity, pp 47-60.
- 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 (2005) Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on an application (Reference EFSA-GMO-UK-2004-01) for the placing on the market of glyphosate-tolerant and insect-resistant genetically modified maize NK603 x MON 810, for food and feed uses under Regulation (EC) No 1829/2003 from Monsanto. The EFSA Journal 309: 1-22.
- EFSA (2006) Guidance document of the scientific panel on genetically organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. 100 p.
http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_guidance/660.html
- Hallauer AR (2000) Potential for outcrossing and weediness of genetically modified insect protected corn. APHIS-USDA.
- Hernández M, Pla M, Esteve T, Prat S, Puigdomènech P, Ferrando P (2003) A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize YieldGard[®] based on the 3'-transgene integration sequence. *Transgenic Research* 12: 179–189.
- Holck A, Va M, Didierjean L, Rudi K (2002) 5'-Nuclease PCR for quantitative event-specific detection of the genetically modified Mon810 MaisGard maize. *Eur Food Res Technol* 214:449–453.
- 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.
- Scanlon NK, Masucci JD, Jennings JC (2007) Amended Report for MSL- 1 8784: Additional Southern Blot and Sequencing Analysis of YieldGard Corn Borer Corn MON 810. Study #: 03-01-39-23 MSL0020709.
- 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.

NK603 x MON 810 (EFSA/GMO/UK/2004/01).

VKM (2005b) Report from an *Ad Hoc* Group appointed by the Norwegian Scientific Panel on Genetically Modified Organisms and Panel on Biological Hazards – An assessment on potentially long-term health effects caused by antibiotic resistance marker genes in genetically modified organisms based on antibiotic usage and resistance patterns in Norway. 62 p.

VKM (2006) Risikovurdering av genmodifisert mais NK603 fra Monsanto (EFSA/GMO/NL/2005/22) (05/315)

VKM (2007a) Risikovurdering av genmodifisert mais MON810, C/DE/02/9 (06/312).

VKM (2007b) Miljørisikovurdering av genmodifisert mais MON810, C/DE/02/9 (07/320).

Vedlegg 1. Sammendrag over godkjenninger av NK603 x MON 810

Land	Utsetting	Mat og/eller fôr	Mat	Fôr	Markedsføring
Argentina	2007	2005			
EU		2007			
Japan	2004	2004			
Korea			2004		
Mexico		2004			
Filippinene	2005		2004	2004	
Sør Afrika	2007	2004			
Kilde: Agbios (2008)					

Vedlegg 2: Sammendrag over godkjenninger av NK603

Land	Utsetting	Mat og/eller fôr	Mat	Fôr	Markedsføring
Argentina	2004	2004			
Australia			2002		
Canada	2001		2001	2001	
Kina		2005			
EU			2004	2004	
Japan	2001		2001	2001	
Korea			2002	2004	
Mexico		2002			
Filippinene	2005			2003	2003
Sør Afrika	2002	2002			
Taiwan			2003		
USA	2000	2000			
Kilde: Agbios (2008)					

Vedlegg 3. Sammendrag over godkjenninger av MON 810

Land	Utsetting	Mat og/eller fôr	Mat	Fôr	Markedsføring
Argentina	1998		1998	1998	
Australia			2000		
Canada	1997		1997	1997	
Kina		2004			
EU	1998	1998			1998
Japan	1996		1997	1997	
Korea			2002	2004	
Mexico		2002			
Filippinene	2002		2002	2002	
Sør Afrika	1997		1997	1997	
Sveits			2000	2000	
Taiwan			2002		
USA	1995	1996			
Uruguay	2003	2003			

Kilde: Agbios (2008)