



**Helse- og miljørisikovurdering
genmodifisert maishybrid Bt11 x MIR162 x GA21
fra
Syngenta Crop Protection AG
(EFSA/GMO/DE/2009/67)**

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

22.10.09

1. innspillsrunde

ISBN: 978-82-8082-357-1

VKM Report 2009: 36

BIDRAGSYTERE

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

VURDERT AV

Faggruppe for genmodifiserte organismer:

Knut Berdal (leder), Thomas Bøhn, Askild Holck, Helge Klungland, Casper Linnestad, Richard Meadow, Anne I. Myhr, Audun Nerland, Ingolf Nes, Kåre M. Nielsen, Hilde-Gunn Opsahl Sorteberg, Odd E. Stabbetorp, Vibeke Thrane, Rose Vikse

Koordinatorer fra sekretariatet:

Arne Mikalsen og Merethe Aasmo Finne

SAMMENDRAG

Helse- og miljørisikovurderingen av den herbicidtolerante og insektsresistente maishybriden Bt11 x MIR162 x GA21 (EFSA/GMO/DE/2009/67) fra Syngenta Crop Protection AG er utført av Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM). Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning (DN) ber Vitenskapskomiteen for mattrygghet om å vurdere den genmodifiserte maishybriden Bt11 x MIR162 x GA21 til import og prosessering, og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Søknaden gjelder ikke dyrking.

Risikovurderingen av den genmodifiserte maisen er basert på dokumentasjonen som er gjort tilgjengelig på EFSAAs nettside EFSA GMO Extranet. I tillegg er det benyttet informasjon fra uavhengige vitenskapelige publikasjoner i vurderingen. Bt11 x MIR162 x GA21 er risikovurdert i henhold til tiltenkt bruk i EU/EØS-området, og faggruppen har derfor ikke vurdert helse- og miljøeffekter knyttet til dyrking av maishybriden. Vurderingen er gjort i overensstemmelse med miljø- og helsekravene i genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven, samt kravene i EU-forordning 1829/2003/EF og utsettingsdirektiv 2001/18/EF med annekser. Det presiseres at de deler av den norske konsekvensutredningsforskriften som vedrører bærekraft, samfunnsnytte og etikk er utenfor VKMs mandat og er ikke vurdert av faggruppen. Videre er EFSAAs retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter (EFSA 2006) og Organisation for Economic Cooperation 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. Videre er agronomiske egenskaper, potensiale for utilsiktede effekter på fitness, genoverføring og effekter på ikke-målorganismer vurdert.

F₁-hybriden er fremkommet ved konvensjonelle kryssinger mellom de transgene maislinjene Bt11, MIR162 og GA21.

Foreldrelinjen Bt11 har fått innsatt de bakterielle genene *cry1Ab* og *pat*, fra henholdsvis *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* og *Streptomyces viridochromogenes*, stamme Tu494. *Cry1Ab*-genet koder for et δ -endotoksin som gir plantene resistens mot enkelte arter i ordenen *Lepidoptera*. *Pat*-genet koder for enzymet phosphinothricin acetyl transferase (PAT), som acetylerer og inaktiverer glufosinat-ammonium, virkestoffet i fosfintocin-herbicide (Finale mfl).

Foreldrelinjen MIR162 har fått innsatt et modifisert *vip3Aa1*-gen (*vip3Aa20*) fra *Bacillus thuringiensis*, stamme AB88. *Vip3Aa20*-genet uttrykker toksinet Vip3Aa20 og gir plantene resistens mot angrep fra larver i insektsordenen *Lepidoptera*, eksempelvis *Agrotis*, *Heliothis*, *Helicoverpa*, *Spodoptera* og *Striacosta*. I tillegg inneholder den innsatte genkonstruksjonen et *pmi*-gen fra *Escherichia coli*. Genet koder for enzymet fosfomannose isomerase (PMI), som omdanner mannose-6-fosfat til fruktose-6-fosfat. Mannose kan derfor benyttes som karbonkilde hos planter som uttrykker *pmi*-genet, og er i denne sammenheng brukt som seleksjonsmarkør under transformasjonsprosessen. MIR162 er ikke søkt godkjent for noen bruksområder i EU, og er ikke tidligere risikovurdert av verken EFSA eller VKM.

Foreldrelinjen GA21 er fremkommet ved introduksjon av et modifisert *5-enolpyruvylsikimat-3-fosfatsyntetasen* (*mepsps*)-gen fra mais. Genet *mepsps* uttrykker enzymet 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfatsyntetasen (mEPSPS), som omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfat, viktige metabolitter i syntesen av aromatiske aminosyrer. N-fosfonometylglycin (glyfosat) hemmer generelt EPSPS-enzymet og blokkerer derved biosyntesen av aromatiske aminosyrer i planter. mEPSPS proteinet skiller seg fra EPSPS proteinet fra villtype-mais

ved at 3 av totalt 445 aminosyrer er endret i mEPSPS proteinet. I motsetning til umodifisert EPSPS i mais er mEPSPS-enzymet også aktivt ved nærvær av glyfosat. GA21-plantene vil derfor tolerere høyere doser av herbicider med virkestoff glyfosat sammenlignet med konkurrerende ugras.

Maislinjen Bt11 x MIR162 x GA21 inneholder ingen markørgener for antibiotikaresistens. Med unntak av MIR162 er samtlige foreldrelinjer som inngår i krysningen, tidligere vurdert av Faggruppe for genmodifiserte organismer (VKM 2006, 2007, 2009a). Faggruppen har også tidligere risikovurdert ulike hybrider der disse foreldrelinjene inngår (VKM 2008, 2009 b, c, d).

Komparative analyser

Analyser av ernæringsmessige komponenter er i hovedsak utført i tråd med OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002). Det er påvist signifikante forskjeller mellom maishybrid Bt11 x MIR162 x GA21 og kontroll i enkeltparametere. Verdiene for de analyserte komponentene ligger imidlertid innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen, samt innenfor toleranseintervallene for de umodifiserte referansesortene som er inkludert i søkers dokumentasjon.

Faggruppen påpeker at søker ikke har foretatt analyser av vitamin C. Det understrekes at konsensusdokumentet i størst mulig grad skal følges når det legges fram dokumentasjon på nivåene av næringsstoffer, antinæringsstoffer og metabolitter

Faggruppen vektlegger at hoveddelen av maisforbruket i Norge er som dyrefôr og at mais til humant konsum utgjør mindre enn 1 % av energiinntaket både for voksne og barn under ett år. Daglig inntak av sukkermais vil bidra med 0,5 % av daglig anbefaling for vitamin C ved inntak lik medianen (data fra Den Norske mor barn studien). Ved maisinntak på 17,5 g/dag (97,5 % persentilen) vil ca 2,6 % av daglig anbefaling for vitamin C dekkes. Når det gjelder dyrefôr ansees det naturlige vitamininnholdet i mais å være uten betydning da all mais som benyttes som fôr vitaminberikes i henhold til Mattilsynets anbefalinger. Tilsvarende angis krav til ernæringsmessig sammensetning av kornbasert barnemat i vedlegg 1 i Forskrift om bearbeidet kornbasert barnemat og annen barnemat til spedbarn og småbarn (FOR 2002-10-18 nr 1185). Faggruppen vurderer derfor at et eventuelt avvikende nivå av vitamin C i Bt11 x MIR162 x GA21 har liten ernæringsmessig betydning i Norge.

Toksisitet og allergenitet

mEPSPS- og PAT- proteinene, som uttrykkes som følge av genmodifiseringen, har ingen likheter med kjente toksiner og allergener, eller egenskaper som tilsier at det vil virke som et allergen eller toksin. Innholdet av disse proteinene i korn er ca 0,01 % av totalt protein, og utgjør således en svært liten del av det totale proteininnholdet. Faggruppen finner det lite sannsynlig at eksponering av mEPSPS og PAT-proteinene i seg selv og i de mengder som tilføres via genmodifisert mais er helsemessig betenkelig. Akutte fôringsstudier (oral sondeføring) på mus med bakterieframstilt mEPSPS-, PAT-, PMI-, Cry1Ab- og Vip3Aa20-protein viser ingen skadelige helseeffekter. Videre konkluderer ernæringsstudier med broilere at maishybriden Bt11 x MIR162 x GA21 er ernæringsmessig lik umodifisert mais.

Faggruppen påpeker at subkronisk fôringsforsøk på rotte med Bt11 x MIR162 x GA21 ikke er utført.

Ingen av proteinene Cry1Ab og Vip3Aa20 har likheter med kjente allergener eller egenskaper som tilsier at de er allergener. Det er imidlertid ikke vurdert om Cry1Ab-toksinet kan ha adjuvanseffekter. d.v.s. fremming av immunreaksjon mot andre stoffer.

Et flertall av medlemmene i Faggruppe for genmodifiserte organismer (8 medlemmer) finner det ikke sannsynliggjort at Cry1Ab har egenskaper som fører til hemming av den toleransen som fordøyelsessystemets slimhinner har mot proteiner (adjuvanseffekt). På bakgrunn av at Cry1Ab-proteinene brytes ned i magesaft og at maten for øvrig inneholder en lang rekke stoffer som virker som adjuvanter, vurderes adjuvansproblemstillingen i forbindelse med Bt11 x MIR162 x GA21 til å være neglisjerbar.

Et mindretall av faggruppen (T. Bøhn, H. Klungland, C. Linnestad, A.I. Myhr, A.H. Nerland, K. M. Nielsen) finner det vanskelig å vurdere om næringsmidler og fôrvarer fra maishybriden Bt11 x MIR162 x GA21 er mer allergifremkallende enn næringsmidler og fôrvarer fra umodifiserte maiskorn. På bakgrunn av foreliggende eksperimentelle studier i mus, som viser at Cry-proteiner kan hemme den toleransen som fordøyelsessystemets slimhinner har mot proteiner, finner imidlertid medlemmene at muligheten for økt allergifremkallende aktivitet hos Bt11 x MIR162 x GA21 med rimelig sikkerhet kan utelukkes.

En samlet faggruppe finner at mat- og fôrprodukter Bt11 x MIR162 x GA21 som ikke inneholder Cry-proteiner, eksempelvis oljebaserte produkter, ikke medfører endret risiko for helse i forhold til annen mais.

Faggruppen har ikke vurdert problematikken knyttet til eventuelle rester av glufosinat og glyfosat, AMPA (metabolitt fra metabolismen av glyfosat) eller andre nedbrytingsprodukter fra disse i mat- og fôrprodukter av Bt11 x MIR162 x GA21. Slike vurderinger utføres av VKMs Faggruppe for plantevernmidler. Faggruppe for GMO legger imidlertid til grunn at produkter, der verdiene ligger under grenseverdiene for akseptabelt daglig inntak, ikke innebærer endret helserisiko i forhold til annen mais.

Miljørisiko

Med unntak av insektsresistens og herbicidtoleranse viser feltforsøk i USA en vekstsesong små eller ingen statistiske signifikante forskjeller mellom den transgene maishybriden Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21 og en umodifisert kontrollinje med hensyn på agronomiske og morfologiske karakterer. Det er ikke foretatt analyser av maishybriden Bt11 x MIR162 x GA21 med hensyn på agronomiske karakterer.

Søknaden gjelder godkjenning av maishybriden Bt11 x MIR162 x GA21 for import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av maishybriden. Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av maishybriden i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Norge er i utkanten av dyrkingsområdet for mais, dyrkingsomfanget er svært begrenset og det er ingen stedege eller introduserte viltvoksende arter som mais kan hybridisere med.

Samlet vurdering

Flertallet av medlemmene i Faggruppe for genmodifiserte organismer (8 medlemmer) finner det lite trolig at bruk av maishybriden Bt11 x MIR162 x GA21 vil medføre endret risiko for helse og miljø i forhold til annen mais. Et mindretall av faggruppen (A.H. Nerland, T. Bøhn, A.I. Myhr, C. Linnestad, H. Klungland, K. M. Nielsen) mener at dersom en ser bort fra adjuvansproblematikken, er det lite trolig at bruk av maishybriden Bt11 x MIR162 x GA21 vil medføre endret risiko for helse og miljø i forhold til annen mais. Mindretallet finner imidlertid at muligheten for økt allergifremkallende aktivitet hos Bt11 x MIR162 x GA21 ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes.

En samlet faggruppe påpeker kunnskapshull knyttet til adjuvans generelt og om Cry-proteinene i Bt11 x MIR162 x GA21 kan virke som adjuvant.

NØKKEWORD

Mais, *Zea mays* (L.), genmodifisert maishybrid Bt11 x MIR162 x GA21, EFSA/GMO/DE/2009/67, herbicidtoleranse, mEPSPS, PAT, glyfosat, glufosinat ammonium, insektsresistens, Cry1Ab, Vip3Aa20, PMI, helsemessig trygghet, helse, miljørisiko, forordning 1829/2003/EF, direktiv 2001/18/EF

FORKORTELSER OG ORDFORKLARINGER

ADF	Acid detergent fiber, fiberfraksjon av ufordøyelig plantemateriale i fôr, vanligvis cellulosefiber dekket med lignin og silikat. Plantematerialet fordøyes med en syre-detergentløsning (ADF). Ufordøyd masse betegnes som ADF. Fôr med lavt ADF-innhold er mer fordøyelig og har større energiinnhold.
Allel	Et bestemt gen kan foreligge i ulike varianter (alleler). Allelene kan være dominante (bestemmende for fenotypen) eller recessive (vikende).
ALS	Acetolactatsyntase-enzym
AMPA	Aminomethylphosphonic acid, nedbrytningsprodukt fra glyfosat.
ARMG	Antibiotikaresistensmarkørgen
Backcross (BC)	Tilbakekryssing. Kryssing mellom en hybridlinje (avkom fra to genetisk ulike foreldre) og en av foreldrelinjene, alternativt en genetisk ekvivalent organisme. Strategi i planteforedling for å overføre primært kvalitative karakterer, for eksempel sjukdomsresistens, til elitelinjer av både kryssbefruktede og selvpollinerte arter. Gjentatte tilbakekryssinger reduserer det genetiske bidraget, som uønskede alleler fra den andre donorplanten. BC ₁ , BC ₂ etc: betegnelse på 1. og 2. tilbakekryssingsgenerasjon, etc.
BLASTn	Algoritme som benyttes for homologisammenligning av nukleotidsekvenser.
BLASTP	Algoritme som benyttes for homologisammenligning av aminosyresekvenser i proteiner.
BLASTx	Algoritme som benyttes for oversetting fra kodende nukleotidsekvenser til aminosyresekvenser.
bp	Basepar
<i>B.t.</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Codex	FAO/WHO-organ som etablerer globale handelsstandarder for mat.
Cry	Krystall protein fra <i>Bacillus thuringiensis</i>
Cry1Ab	δ-endotoksin isolert fra jordbakterien <i>Bacillus thuringiensis</i> subspecies <i>kurstaki</i> . Toksinet gjør maisplante resistente mot angrep fra enkelte arter i ordenen <i>Lepidoptera</i> .
DN	Direktoratet for naturforvaltning
DNA	Deoxyribonukleinsyre (DNA)
Dominant allel	Et allel som uttrykker samme fenotype, uavhengig av om allelene i genparet er like (homozygot) eller ulike (heterozygote).
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPSPS	5-enolpyruvylsukinat-3-fosfatsyntase
FAO	Food and Agriculture Organization, FNs organisasjon for ernæring og landbruk.
FIFRA	US EPA Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act. USAs føderale lov om insektdrepende midler, soppdrepende midler og midler mot skadedyr.
Fitness	Et individs relative evne til å føre sine gener/alleler videre til kommende generasjoner.
GAT	Glyfosatacetyltransferase-enzym
GLP	Good Laboratory Practices, retningslinjer for godt laboratoriearbeid.
Glufosinat ammonium	Bredspektret herbicid
Glyfosat	Bredspektret herbicid
GMO	Genmodifisert organisme
GMP	Genmodifisert plante
Herbicid	Ugrasmiddel
Locus	Spesifikk posisjon på kromosomet der et gen er lokalisert.
MALDITOF	Massespektrometrimetode for å måle molekylvekt til peptider.
Mannose	Monosakkarid

Mendelsk nedarving	Lovmessig nedarvingsmønster ved ulike typer kryssinger.
MT	Mattilsynet
NDF	Neutral detergent fiber, dvs. fiberfraksjon som inneholder hemicellulose og ADF.
Northern blot	Teknikk for overføring av RNA til en membran for videre studier av overførte RNA-sekvenser.
Nær-isogen linje	Linjer eller sorter som er genetisk identiske, med unntak av ett locus eller kromosomsegment.
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
ORF	Open Reading Frame (åpen leseramme)
OSWP	Overseason whole plant
PAT	Fosfinotricin-N-acetyltransferase
PCR	Polymerase chain reaction. Polymerase kjedereaksjon. Metode for å syntetisere et stort antall kopier av en DNA-sekvens vha primere.
RNA	Ribonukleinsyre
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat (SDS)-polyakrylamidelektroforese. Elektroforesemetode for separasjon av proteiner.
Southern blot	Teknikk for overføring av DNA til en membran for videre studier av overførte DNA-sekvenser.
T-DNA	DNA fra Ti-plasmidet som er i jordbakterien <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Ti-plasmidet (Transfer-DNA) overføres fra bakterien, og settes inn i plantecelleenes kjernegenom. T-DNAet som overføres avgrenses av V (venstre) og H (høyre) flankesekvenser, og begrenser derfor den delen av Ti-plasmidet som overføres og gjør at resten av vektoren ikke blir satt inn i plantekromosomene.
USDA	United States Department of Agriculture
U.S. EPA	United States Environmental Protection Agency, USAs miljøvernmyndigheter
Utviklingsstadier hos mais:	
	<u>Vegetative stadier</u>
	VE: oppspiring
	V1: 1. blad
	V2: 2. blad
	V(n): n'te blad
	VT: synlige hannblomsterstand (tassel)
	<u>Reproduktive stadier</u>
	R1: synlige hunnblomster
	R2: 'blister'
	R3: melkematning
	R4: deigmatning
	R5: dent
	R6: fysiologisk moden
Vip3Aa20	Modifisert VIP3Aa2-toksin fra jordbakterien <i>Bacillus thuringiensis</i> stamme AB88. Toksinet gjør maisplante resistente mot angrep fra enkelte arter i ordenen <i>Lepidoptera</i> .
Western-blot	Metode for overføring av proteiner til en membran som binder protein.
WHO	World Health Organisation. Verdens helseorganisasjon, organ under FN
ZM-HRA	ZM står for <i>Zea mays</i> , og HRA er et acetolaktatenzym fra mais. Enzymet er blitt endret ved at to aminosyrer er byttet ut. Enzymet er tolerant for herbicider som hemmer ALS-enzymet.

INNHALDSFORTEGNELSE

BIDRAGSYTERE.....	2
VURDERT AV	2
SAMMENDRAG	3
NØKKEWORD	6
FORKORTELSER OG ORDFORKLARINGER.....	7
INNHALDSFORTEGNELSE	9
BAKGRUNN	10
OPPDRAK FRA DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING OG MATTILSYNET.....	10
RISIKOVURDERING	12
1. Innledning	12
1.1. Beskrivelse av egenskaper og virkningsmekanismer.....	12
2. Molekylær karakterisering	13
2.1. Hybridproduksjon	13
2.2. Evaluering av foreldrelinjer	13
3. Komparative analyser	29
3.1. Forsøksdesign og valg av komparator	29
3.2. Analyser av ernæringsmessige komponenter	30
3.3. Agonomiske egenskaper.....	33
3.4. Delkonklusjon.....	35
4. Dokumentasjon av toksisitet og allergisitet.....	36
4.1. Toksisitet	36
4.2. Allergisitet	39
4.3. Delkonklusjon.....	41
5. Miljørisikovurdering	42
5.1. Potensiale for utilsiktede effekter på fitness relatert til genmodifiseringen	42
5.2. Potensiale for genoverføring.....	43
5.3. Potensiale for samspill mellom GMP og målorganismer	44
5.4. Potensiale for samspill mellom GMP og ikke-målorganismer	45
5.5. Overvåking	45
5.4. Delkonklusjon.....	45
6. Vurdering av søkers dokumentasjon.....	46
KONKLUSJON.....	48
REFERANSER	50

BAKGRUNN

Vitenskapskomiteen for mattrygghet er bedt av Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning om å foreta en utredning av helse- og miljørisiko ved en eventuell godkjenning av den genmodifiserte maishybriden Bt11 x MIR162 x GA21 (EFSA/GMO/DE/2009/67). Maishybriden er søkt omsatt i EU/EØS-området under Forordning (EF) No. 1829/2003 om genmodifiserte næringsmidler og fôrvarer (artiklene 3(1) og 15(1)). Søknaden omfatter bruksområdene import, prosessering, næringsmidler og fôrvarer, men inkluderer ikke dyrking.

Søknaden ble fremmet og anbefalt av tyske myndigheter i februar 2009. Dokumentasjonen knyttet til søknaden ble lagt ut på EFSA-nett 13. juli 2009, med frist på 90-dager for innspill fra EU- og EØS/EFTA-landene. Norge har ikke tidligere uttalt seg om Bt11 x MIR162 x GA21.

I EU er maishybriden Bt11 x MIR162 x GA21 søkt godkjent for forsøksutsetting i Den Tsjekiske republikk i perioden 2009-2012. (http://gmoinfo.jrc.ec.europa.eu/gmp_browse.aspx).

Foreldrelinjen Bt11 er godkjent som fôrmais under direktiv 90/220/EF, og som søtmais under forordning (EF) nr. 258/97. Linjen ble videre notifisert som eksisterende produkt under forordning 1829/2003/EF, artikkel 8 og 20, til bruk som mat, fôr, samt tilsetningsstoffer til mat og fôr. Godkjenningen av Bt11 gikk ut 18. april 2007, og Syngenta har søkt om fornyet godkjenning fram til 2017 (EFSA/GMO/RX/Bt11). Maislinjen Bt11 er også søkt godkjent for dyrking i EU/EØS-området (C/F/96.05.10).

GA21 ble godkjent for til bruk som mat og fôr i 2008, og en søknad som også omfatter dyrking er for tiden under behandling i EU (EFSA/GMO/UK/2008/60).

Foreldrelinje MIR162 er hittil ikke søkt godkjent for noen bruksområder i EU.

I Norge ble maislinjene Bt11 og GA21 innmeldt som prosessert fôrvare under den nasjonale overgangsordningen for eksisterende GM-produkter 15. mars 2006 (jfr. fôrvareforskriftens § 7a), og var i utgangspunktet tillatt å omsette på det norske markedet fram til 15. september 2008. På bakgrunn av at implementeringen av EUs GM-regelverk har tatt lengre tid enn antatt, har Mattilsynet vedtatt å forlenge dispensasjonen om krav til godkjenning fram til 15. september 2010. Notifiseringene omfatter kun prosesserte, ikke spiredyktige fôrvarer til oppdrettsfisk, og gjelder ikke husdyrfôr. http://www.mattilsynet.no/for/dispensasjon_fra_godkjenningskrav_i_f_ocirc_rvareforskriften_73820

Foreldrelinjene Bt11 og GA21 inngår også i flere andre hybridlinjer som er under vurdering av EFSA (MIR604 x GA21 (EFSA/GMO/UK/2007/48) og Bt11 x GA21 (EFSA/GMO/UK/2007/49), Bt11 x MIR604 (EFSA/GMO/UK/2007/50).

Bt11 x MIR162 x GA21 er foreløpig ikke godkjent for kommersiell dyrking eller omsetning som mat og/eller fôr i noen land (Agbios 2009; EFSA/GMO/DE/2009/67). I følge søker er hybridene søkt godkjent i en rekke land og er i ulike faser av godkjenningsprosedyren.

OPPDRAK FRA DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING OG MATTILSYNET

Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning har i brev datert 12.5.2006 (ref. 2006/17817) og 3.7.2009 (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/DE/2009/67, genmodifisert maishybrid Bt11 x MIR162 x GA21, ble lagt ut på EFSA-nett 13. juli 2009. Faggruppe for genmodifiserte organismer skal i tråd med oppdragsbrev utarbeide helse- og miljørisikovurdering av maishybriden til import og industriell prosessering, samt til bruk som næringsmiddel og fôrvare. Søknaden omfatter ikke dyrking. Vurderingen skal utføres i henhold til tiltenkt bruk og i overensstemmelse med prinsippene som er nedfelt i EFSA's retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter ("Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed") (EFSA 2006).

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

Produktet som ønskes vurdert

Genmodifisert mais, EFSA/GMO/DE/2009/66 (Bt11 x MIR162 x GA21).

Unik kode: SYN-BTØ11-1 x SYN-IR162-4 x MON-ØØØ21-9.

Status i EU: Søknad under forordning 1829/2003/EF. Frist for innspill til EFSA-nett: 22.10.09.

Ønsket svarfrist til Mattilsynet/DN: 19.10.09.

RISIKOVURDERING

1. Innledning

Helse- og miljøvurderingen av den genmodifiserte mais Bt11 x MIR162 x GA21 er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSA's nettside EFSA GMO Extranet. I tillegg er det benyttet uavhengige vitenskapelige publikasjoner med referee i vurderingen. Vurderingen er gjort i henhold til tiltenkt bruk og i overensstemmelse med miljø- og helsekravene i genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven. Videre er kravene i EUs forordning 1829/2003/EF og utsetningsdirektiv 2001/18/EF med annekser lagt til grunn for vurderingen.

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

Faggruppen har vedtatt å benytte EFSA's retningslinjer som retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter. Prinsippene som er lagt til grunn for vurderingen er derfor hentet fra EFSA's 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). Ved vurdering av vesentlig likhet har faggruppen lagt vekt på OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002), som gir anbefalinger over hvilke parametere som bør undersøkes.

Det er kun medlemmene i Faggruppe for genmodifiserte organismer som har vurdert den genmodifiserte maisen.

1.1. Beskrivelse av egenskaper og virkningsmekanismer

Maishybriden er fremkommet ved konvensjonelle kryssinger mellom maislinjene Bt11, MIR162 og GA21. Bt11 x MIR162 x GA21 uttrykker proteinene Cry1Ab, Vip3Aa20, mEPSPS, PAT og PMI, som gir maisplantene resistens mot angrep fra skadegjørere i ordenen *Lepidoptera* (sommerfugler), samt toleranse mot herbicider med virkestoff glyfosat og glufosinat-ammonium. Genet koder for enzymet fosfomannose isomerase (PMI), som omdanner mannose-6-fosfat til fruktose-6-fosfat. Mannose kan derfor benyttes som karbonkilde hos planter som uttrykker *pmi*-genet, og er i denne sammenheng brukt som seleksjonsmarkør under transformasjonsprosessen.

2. Molekylær karakterisering

2.1. Hybridproduksjon

Hybridforedling er den dominerende foredlingsstrategien i konvensjonell foredling og sortsutvikling i mais i dag. Metodikken innebærer utvikling av innavlede, tilnærmet homozygote foreldrelinjer, som så krysses for produksjon av F1-hybridfrø. Dette gir ensartede og produktive sorter (heterosiseffekt). Den transgene hybriden Bt11 x MIR162 x GA21 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom maislinjene Bt11, MIR162 og GA21.

2.2. Evaluering av foreldrelinjer

2.2.1. Maislinje Bt11

Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

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

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

Karakterisering av geninnsettingen/genkonstruksjonen

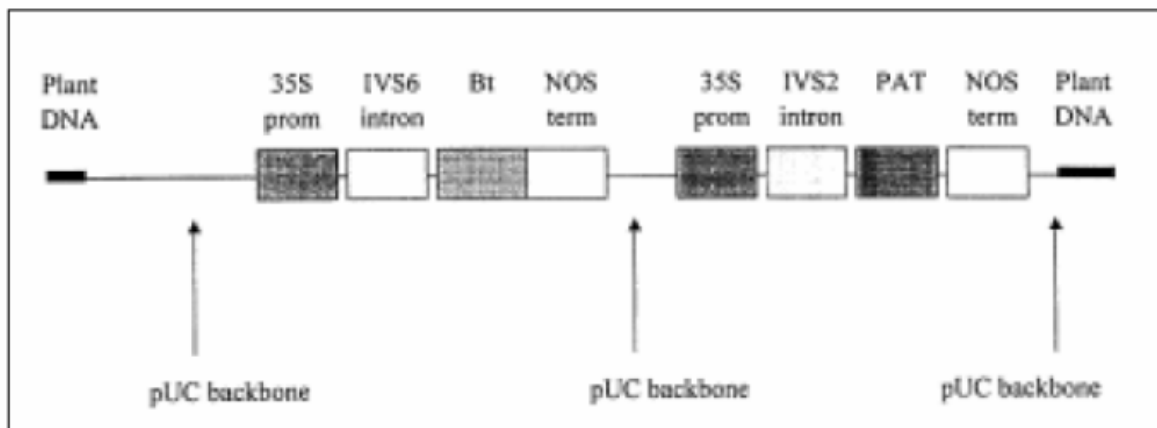
Southern blot og PCR har blitt brukt for å karakterisere det rekombinante DNA-fragmentet i planten. Molekylærbiologisk karakterisering viser at det er satt inn bare en kopi av det rekombinante DNA-fragmentet i maisens genom. Dette fragmentet inneholder følgende gener og DNA-elementer (se figur 1):

CryIAb-ekspresjonskasset

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

Pat-ekspresjonskasset

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



Figur 1. Gener og regulatoriske elementer satt inn i Bt11.

Baserekvensen til *cry1Ab*-genet stammer fra jordbakterien *Bacillus thuringiensis*. Bakgrunnen for glufosinattoleransen er *pat*-genet, som stammer fra jordbakterien *Streptomyces viridochromogenes*. *Pat*-genet uttrykker enzymet fosfinitricin acetyltransferase (PAT, phosphinothricin acetyl transferase) som har høy spesifisitet overfor fosfinitricin (glufosinat), som er den aktive komponenten i herbicider av glufosinat-typen. PAT inaktiverer fosfinitricin ved N-acetylering og beskytter derved planten i et fosfinitricinmiljø. Baserekvensene i genet er endret slik at genet kan uttrykkes i planter. PAT proteinets aminosyresekvens i planten er lik bakterieproteinets aminosyresekvens.

Molekylærbiologiske analyser viser at det rekombinante fragmentet i planten inneholder de samme gener og genelementer som er på det tilsvarende T-DNA fragmentet i plasmidet pZO1502. Cry1Ab- og PAT proteinet som uttrykkes i maiskorn er undersøkt med Western-blot analyse og densitometri, SDS-PAGE og densitometri, trypsinbehandling av proteinene og peptidkartlegging med SDS-PAGE, CNBR-behandling og Southern blot, aminosyreanalyse av N-enden til proteinet, samt glykosyleringsanalyse.

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

Det ble ikke påvist glykoliseringssteder på proteinene.

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

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

Uttrykk av Cry1Ab- og PAT-protein ble målt i prøver fra ulike plantevev på to utviklingsstadier. Prøvene som er analyserte stammer fra et feltforsøk utført på Syngentas forsøksstasjon i USA i 2006.

Forsøksfeltet bestod av et fullstendig randomisert blokkdesign med fem gjentak. Det ble tatt ut to + to prøver av maisplantene fra hver blokk. Detaljer av disse analysene betraktes av Syngenta som konfidensiell informasjon. Prøvene ble tatt av planter fra en hybridlinje og en innavlet linje avledet av Bt11.

Nivået av Cry1Ab i pollen var lavere enn påvisningsgrensen på 0,5 µg/g tørrvekt. Gjennomsnittlig mengde Cry1Ab ble målt til 32,5 µg/g tørrvekt i blad (SD=1,7, variasjonsbredde = 26,8 – 40,6), 10,3 µg/g tørrvekt i røtter (SD=0,5, variasjonsbredde = 8,0 - 12,7), 1,4 µg/g tørrvekt i modne korn (SD=0,3 variasjonsbredde = 0,8 – 1,8) og 18,8 µg/g tørrvekt i hel plante (SD=1,5, variasjonsbredde = 13,0 – 21,3).

Det ble ikke påvist PAT-protein i prøver fra pollen og korn. Gjennomsnittlig mengde i blad ble målt til 0,6 µg/g tørrvekt (SD=0, variasjonsbredde = 0,5 – 0,7), mens innholdet av PAT i røtter og hel plante ble målt til henholdsvis 1,0 µg/g tørrvekt (SD=0,1, variasjonsbredde = 0,6 – 1,3) og 0,7 µg/g tørrvekt (SD=0,1, variasjonsbredde = 0,7 – 0,8).

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

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

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

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

- en kopi av transformert DNA er satt inn.
- ved hjelp av RFLP-kartlegging er det vist at det rekombinante fragmentet med *cry1Ab*- og *pat*-genene er lokalisert på den korte armen til kromosom 8
- spaltingsanalyse over flere generasjoner viser at genene *cry1Ab* og *pat* er tett koblet og segregerer som et enkelt, dominant Mendelsk lokus.
- nesten alle plantedeler uttrykker Cry1Ab-proteinet. PAT-enzymet uttrykkes kun i blad og deler av hann- og hunn blomster. Ingen andre innsatte nukleotidsekvenser blir uttrykt.

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

Delkonklusjon

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

2.2.2 Maislinje MIR162

Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

I følge søkers dokumentasjon er det benyttet *Agrobacterium*-mediert transformering av umodne maisceller fra den umodifiserte maislinjen NP2500 x NP2499. Den binære vektoren pNOV1300, som inneholder et rekombinant DNA-fragment, ble benyttet til transformasjonen. Det rekombinante DNA-

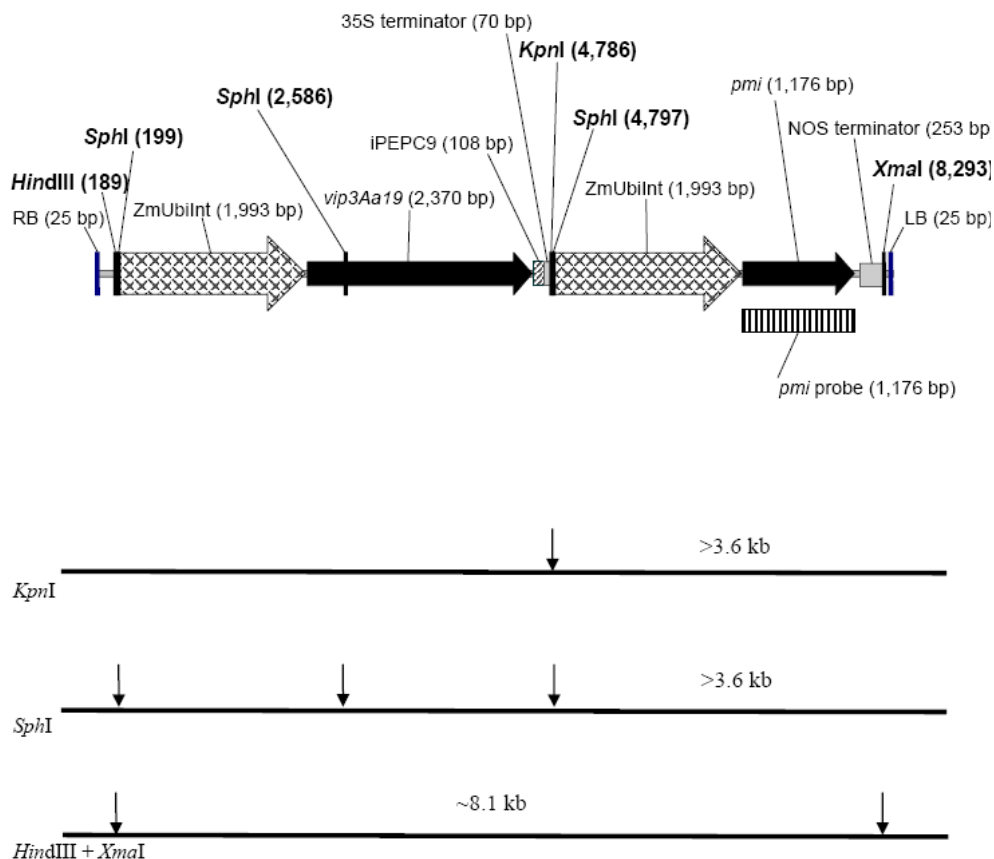
fragmentene (T-DNA) som er satt inn i maisgenomet inneholder en *vip3Aa19*- og en *pmi*-ekspressjonskasset.

Vip3Aa19-ekspressjonskassetten inneholder et modifisert *vip3Aa1*-gen (*vip3Aa19*), et ZmUbiIntron-promoterområde med intron 1 fra mais *polyubiquitin* genen, intron iPEPC9 fra *fosfoenolpyruvatkarboksylase*-genet og 35S terminator. *Vip3Aa19*-proteinet skiller seg fra *Vip3Aa1*-proteinet ved at lysin i posisjon 284 er endret til glutamin.

Pmi-ekspressjonskassetten inneholder *pmi*-genet fra *E. coli*, ZmUbiInt-promoterområde med intron 1 fra *polyubiquitin*-genet fra mais og 3' ikke-translatert område fra *nopalinsyntase* (NOS) området fra *Agrobacterium tumefaciens*. NOS avslutter (terminerer) transkripsjonen. *Pmi*-genet brukes som sleksjonsmarkør ved at maiscellen kan vokse i nærvær av mannose. DNA-fragmentet inneholder ikke antibiotikaresistens-gener (tabell 1 og figur 2).

Karakterisering av geninnsettingen/genkonstruksjonen

Southern blot-, TaqMan PCR- og sekvensanalyse av DNA isolert fra blad viser at et nesten fullengde kopi av pNOV1300 rekombinante T-DNA-fragment er satt inn i maisens genom. Molekylærbiologisk karakterisering viser at det er satt inn bare en kopi av det rekombinante DNA-fragmentet i maisens genom. DNA -fragmentet med gener og regulatoriske elementer er vist i figur 2.



Figur 2. Gener og regulatoriske elementer satt inn i MIR162.

Tabell 1. Beskrivelse av innsatte gener og regulatoriske elementer.

Genetic Element	Location in pNOV1300 (bp)	Size (bp)	Function
ACTIVE INGREDIENT CASSETTE			
ZmUbilnt	200 - 2192	1993	Promoter region from <i>Z. mays</i> polyubiquitin gene which contains the first intron (Entrez Accession Number S94464 (NCBI, 2006)). Provides constitutive expression in monocots (Christensen <i>et al.</i> , 1992).
<i>vip3Aa19</i>	2214 - 4583	2370	A modified version of the native <i>vip3Aa1</i> gene (Estruch <i>et al.</i> , 1996) found in the bacterium <i>B. thuringiensis</i> strain AB88, which was isolated from sour milk. The <i>vip3Aa19</i> gene was modified to accommodate the preferred codon usage in maize (Murray <i>et al.</i> , 1989). The <i>vip3Aa19</i> gene (Entrez Accession Number DQ539887 (NCBI, 2006)) encodes a Vip3Aa19 protein that differs from the Vip3Aa1 protein encoded by the <i>vip3Aa1</i> gene by a single amino acid at position 284. The <i>vip3Aa1</i> gene encodes lysine at position 284 and the <i>vip3Aa19</i> gene encodes glutamine. Vip3Aa proteins confer resistance to several lepidopteran insects.
iPEPC9	4600 - 4707	108	Intron #9 from the phosphoenolpyruvate carboxylase gene (Entrez Accession Number X15239 (NCBI, 2006)) from <i>Z. mays</i> (Hudspeth and Gula, 1989).
35S	4710 - 4779	70	Terminator sequence from the 35S DNA from the cauliflower mosaic virus genome (Terminator region from Entrez Accession Number AF140604 (NCBI, 2006)). Its function is to provide a polyadenylation sequence (Franck <i>et al.</i> , 1980).
SELECTABLE MARKER CASSETTE			
ZmUbilnt	4798 - 6790	1993	Promoter region from <i>Z. mays</i> polyubiquitin gene which contains the first intron (Entrez Accession Number S94464 (NCBI, 2006)). Provides constitutive expression in monocots (Christensen <i>et al.</i> , 1992).
<i>pmi</i>	6803 - 7978	1176	<i>E. coli pmi</i> gene encoding the enzyme phosphomannose isomerase (PMI) (Entrez Accession Number M15380 (NCBI, 2006)); this gene is also known as <i>manA</i> . Catalyzes the isomerization of mannose-6-phosphate to fructose-6-phosphate (Negrotto <i>et al.</i> , 2000).
NOS	8039 - 8291	253	Terminator sequence from the nopaline synthase gene of <i>A. tumefaciens</i> (Entrez Accession Number V00087 (NCBI, 2006)). Its function is to provide a polyadenylation site (Depicker <i>et al.</i> , 1982).

Karakterisering av geninnsettingen/genkonstruksjonen

Southern blot-, TaqMan PCR- og sekvensanalyse av DNA isolert fra blad, viser at et nesten fullengde kopi av pNOV1300 rekombinante DNA-fragment er satt inn i maisens genom. Molekylærbiologisk karakterisering viser at det er satt inn bare en kopi av det rekombinant DNA-fragmentet i maisens genom.

Molekylærbiologiske analyser viser at det rekombinante fragmentet i planten inneholder de samme gener og genelementer som finnes på det tilsvarende rekombinante T-DNA-fragmentet i vektoren pNOV1300. Totalt er 8314 bp av T-DNAet satt inn i maisen. Ved innsettingen ble hele venstre og høyre grense på T-DNA-fragmentet, pluss 32 bp og 2 bp genomisk DNA fra henholdsvis 5'- og 3'-delen av t-DNA-fragmentet kuttet bort under transformasjonsprosessen. Det er også påvist to

nukleotide-endringer i *vip3Aa19*-genet. En av endringene har ført til en enkelt aminosyre-endring i *vip3Aa19*-genets posisjon 129, fra aminosyre metionin til isoleucin. Den andre nukleotide-endringen førte ikke til endring i aminosyresekvensen. Denne aminosyresekvensendringen har ikke resultert i endringer i enzymets funksjon. På grunn av endringen i aminosyresekvensen er MIR162 *vip*-genet blitt navnet *vip3Aa20* og proteinet Vip3Aa20. Det er ikke påvist vektorsekvenser som ligger utenfor plasmidets høyre- og venstre grense.

Analysen av genomiske flankesekvenser til det rekombinante T-DNA-fragmentet.

PCR-analyser av det rekombinante DNA-fragmentet i MIR162 viser at flankesekvensene til T-DNA-fragmentet er genomisk DNA fra mais. Flankerende sekvenser til dette rekombinante DNA-fragmentet er sekvensert 1000 bp oppstrøms (5'-enden til T-DNAet) og nedstrøms (3'-enden til T-DNAet). Det ble påvist signifikant homologi hovedsakelig til mais "Dissociation1 (Ds1)-beslektet transposable elementer. Dette Ds1-homologe området ligger 500 bp fra T-DNA-fragmentet. Sekvensanalyser nedstrøms for T-DNA-fragmentet viser homologi til en sekvens fra *cyklofilin*-genet, men den homologe sekvensen er ikke del av kodeområdet til *cyklofilin*-genet.

Nomenklatur vip-toksiner

Vip-toksiner dannes av *Bacillus thuringiensis*. Nomenklatur for Cry-toksiner ble først foreslått i 1993 og seinere revidert i 1998 (Crickmore *et al.* 1998). Denne nomenklaturen er basert på aminosyresekvenslikhet i toksinene. Seinere ble det foreslått at Vip-toksiner skal ha tilsvarende nomenklatur som Cry-toksiner (Crickmore *et al.* 2009).

Navnet på proteinet skrives alltid med stor forbokstav: "Vip". Gennavnet skrives med stor forbokstav i begynnelsen av en setning og liten forbokstav inne i setningen. Familienavnet skrives med et arabisk tall. Under-familienavnet skrives med stor bokstav og under-under-familienavnet skrives med liten bokstav. Et avsluttende tall identifiserer det enkelte proteinet (toksinet) eller genet (Crickmore *et al.* 2009). Eksempel: Vip3Aa20-toksin; *vip3Aa20*-gen.

Vip-toksinene er delt inn i tre gen-familier, *Vip1*, *Vip2* og *Vip3*. *Bacillus cereus* uttrykker toksiner hovedsakelig fra familiene *Vip1* og *Vip2*, mens *B. thuringiensis* uttrykker *Vip3*-toksiner. Ved testing av 41 standard *Bt*-referansestammer og 118 lokale *Bt*-isolater ble det påvist 3 stammer som inneholdt *vip1*- og *vip2*-gener (Shi *et al.* 2007). Vip-toksinene som uttrykkes fra disse to genfamiliene var ikke toksiske mot *Culex*-, *Spodoptera*-, *Helicoverpa*- og *Tenebrio*-larver. Vip-toksiner dannes under den vegetative fasen til bakterien, og undersøkelser av Estruch *et al.* (1996) viser at *Vip3Aa*-toksinet hovedsakelig skiller ut (>75 %) i kulturmediet. Vip-toksiner er ikke δ -endotoksiner som Cry-toksiner, og *Vip3A*-toksiner har heller ingen strukturell homologi til δ -endotoksiner som uttrykkes av *Bacillus thuringiensis*.

Karakterisering av proteinene.

Det er benyttet en rekke teknikker for å karakterisere proteinene. Disse er Western blot, peptidmasseanalyser, bioaktivitet-assay, enzymaktivitets-assay og glykoliseringsanalyser. *E. coli*-produserte proteiner ble benyttet som standarder for de ulike analysene.

Vip3Aa20- og PMI-protein ble rensert ut fra bladvev fra MIR162. Påvisning med polyklonale antistoffer viser at rensert planteproduert *Vip3Aa20*- og PMI-protein har de forventede molekylvektene. Glykoliseringsanalyser viser at ingen av proteinene har glykoliserings seter. Peptidmasseanalyser viser at trypsinspaltet *Vip3Aa20*-protein har tilsvarende peptidmasseprofil som *E. coli*-produsert protein. Insektlarvebioassay viser at planteproduert og *E. coli*-produsert *Vip3Aa20*-toksin har tilsvarende larvedepende aktivitet. Søker konkluderer med at *Vip3Aa20*- og PMI-protein er ekvivalent til de *E. coli*-produserte proteinene, og at *E. coli*-produserte proteiner er egnet som erstatning for planteproduert protein i helseisikovurderinger.

Syngenta har også foretatt bioassay-testing av *E. coli*-produsert toksin. Toksinet ble inkubert i 30 min ved temperaturene 4, 25, 37, 65 og 95 °C. Proteinene var toksiske overfor larver av *Spodoptera frugiperda* etter inkubasjon ved 4, 25 og 37 °C, men inaktivt etter inkubasjon ved 65 °C og 95 °C.

Mengde Vip3Aa20-toksin som ble benyttet ved 4, 25 og 37 °C var ca. 7,5-960 ng/cm² fôr, og ved 65 °C og 95 °C 30-3840 ng/cm² (tabell 3). Det ble benyttet 48 larver ved hvert av forsøkene. LC₅₀ (letal konsentrasjon) ble beregnet for hvert av forsøkene, og disse er gjengitt i tabell 2. Effekter av toksinet og temperatur ved de forskjellige toksinkonsentrasjonene er gjengitt i tabell 3.

Tabell 2. Effekt av temperatur på insektisidaktivitet hos Vip3Aa20 fra rekombinant *E.coli* testsubstans MIR162VIP3A-0106) i bioassay med larver av *Spodoptera frugiperda*: LC₅₀-verdier og 95 % konfidensintervall.

Temperatur [°C]	LC ₅₀ [ng Vip3Aa20/cm ²]	90 % konfidensintervall [ng Vip3Aa20/cm ²]
4	35,54	29,03 - 43,08
25	25,62	20,65 - 31,21
37	32,33	25,84 - 39,77
65	>3840	Ikke estimert
95	>3840	Ikke estimert

Tabell 3. Effekt av temperatur på insektisidaktivitet hos Vip3Aa20 fra rekombinant *E.coli* testsubstans MIR162VIP3A-0106) i bioassay med larver av *Spodoptera frugiperda*: % mortalitet.

Konsentrasjon [ng Vip3Aa20/cm ² diett]	Mortalitet etter 120 t [%]				
	4 °C	25 °C	37 °C	65 °C	95 °C
7,5	13	10	13	Ikke testet	Ikke testet
15	23	44	38	Ikke testet	Ikke testet
30	33	48	42	6	4
60	69	75	56	6	2
120	90	92	88	8	2
240	94	98	96	4	8
480	100	100	100	0	0
960	100	100	100	6	2
1920	Ikke testet	Ikke testet	Ikke testet	10	0
3840	Ikke testet	Ikke testet	Ikke testet	4	0
Kontroll vann	0				
Kontroll buffer	0				

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

I dokumentasjonen fra Syngenta presenteres resultater fra målinger av proteinuttrykk i prøver av plantemateriale fra feltforsøk i USA. Forsøkene inkluderte to ulike hybridlinjer av MIR162 (MIR162-A og MIR162-B), som ble testet i randomiserte blokkforsøk i henholdsvis Illinois og Nebraska vekstsesongen 2005. Hybridene var hemizygoter for begge transgenene. Detaljer av disse analysene er klassifisert som konfidensiell informasjon av søker.

Det ble tatt prøver av fire planter fra hver hybridlinje fra hver replikerte blokk. Uttrykket av Vip3Aa20- og PMI-proteinene ble målt ved hjelp av enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) i prøver av blad, røtter, korn, stilk, hunnblomster (arr), pollen og hel plante på ulike tidspunkt gjennom vekstsesongen (V9-V12 (ca 8 uker etter planting)), blomstring, frømodning, visning (ca 23-24 uker etter planting)). For beskrivelse av utviklingsstadier hos mais, se forkortelser og ordforklaringer.

Det ble påvist VipAa20-protein i alle undersøkte vev og utviklingsstadier (tabell 4). I gjennomsnitt over alle vekststadier varierte nivået av proteinet i blad, røtter og hel plante mellom henholdsvis 13,88-148,21 µg/g t.v., 12,57-33,33 µg/g t.v. og 25,05-93,52 µg/g t.v. Gjennomsnittlige konsentrasjoner av Vip3Aa20 i frø ved modning og visning varierte mellom 33,57-45,72 µg/g t.v., mens nivået i pollen var 47,13 µg/g t.v. På arealbasis viste estimater av totalmengde Vip3Aa20 høyest nivå ved frømodning.

Tilsvarende viser søkers dokumentasjon kvantifiserbare nivåer av PMI-protein i de fleste undersøkte plantevev. I gjennomsnitt over alle vekststadier varierte nivået av proteinet i blad, røtter og hel plante mellom henholdsvis <0,21-12,85 µg/g t.v., 0,76-4,97 µg/g t.v. og 1,92-8,99 µg/g t.v. I frøet varierte konsentrasjonen av PMI fra 0,69-2,23 µg/g t.v. ved henholdsvis modning og visning.

Ingen nye åpne leserammer (ORF) ble identifisert ved 5'- og 3'-enden til T-DNA-fragmentet og genomiske maissekvenser.

Tabell 4. Gjennomsnittlige konsentrasjoner av proteinet Vip3Aa20 uttrykt i ulike plantevev og på ulike utviklingsstadier i to hybridlinjer av MIR162 ($\mu\text{g/g t.v.}$).

Vev	Hybrid & Lokalitet ¹	Gjennomsnittlige konsentrasjoner av Vip3Aa20 $\mu\text{g/g t.v.} \pm \text{S.D. (variasjonsområde)}$			
		V9-V12	Blomstring	Frømodning	Visning
Blad	MIR162-A BMI	79,79 \pm 3,18 (76,123-81,78)	109,76 \pm 7,84 (104,68-118,79)	95,37 \pm 15,93 (77,25-118,60)	28,75 \pm 2,49 (25,88-30,28)
	MIR162-B YNE	114,72 \pm 7,09 (106,54-119,12)	105,72 \pm 11,52 (97,10-118,80)	148,21 \pm 11,40 (136,85-159,66)	13,88 \pm 0,93 (12,93 – 14,80)
Røtter	MIR162-A BMI	33,33 \pm 2,20 (31,28-35,65)	27,42 \pm 1,71 (26,30-29,38)	25,79 \pm 2,79 (22,57-27,48)	30,75 \pm 1,20 (30,00-32,13)
	MIR162-B YNE	30,26 \pm 3,69 (28,10-34,52)	29,26 \pm 0,82 (28,72-30,20)	14,79 \pm 4,48 (9,87-21,83)	12,57 \pm 1,50 (11,58-14,30)
Stilk	MIR162-A BMI	N/A	30,36 \pm 0,96 (29,43-31,35)	55,70 \pm 2,84 (52,74-58,41)	N/A
	MIR162-B YNE	N/A	33,06 \pm 2,87 (30,52-36,18)	60,72 \pm 3,60 (56,71-63,68)	N/A
Korn	MIR162-A BMI	N/A	N/A	45,72 \pm 4,70 (41,10-50,50)	33,57 \pm 2,37 (30,90-35,42)
	MIR162-B YNE	N/A	N/A	41,40 \pm 0,93 (40,47-42,32)	34,92 \pm 2,85 (31,99-37,67)
Hunnblomster	MIR162-A BMI	N/A	63,10 \pm 2,28 (60,54-64,90)	N/A	N/A
	MIR162-B YNE	N/A	131,70 \pm 16,15 (117,01-149,00)	N/A	N/A
Pollen	MIR162-A BMI	N/A	42,72 \pm 1,10 (41,45-43,36)	N/A	N/A
	MIR162-B YNE	N/A	51,53 \pm 2,59 (48,60-53,52)	N/A	N/A
Hel plante	MIR162-A BMI	89,54 \pm 0,80 (88,68-90,26)	65,17 \pm 3,99 (61,68-69,52)	59,83 \pm 4,24 (55,06-63,14)	43,54 \pm 10,09 (37,15-55,17)
	MIR162-B YNE	93,52 \pm 4,15 (88,78-96,51)	70,05 \pm 2,35 (68,04-72,63)	38,24 \pm 3,68 (34,84-42,14)	25,05 \pm 3,79 (21,12-28,68)

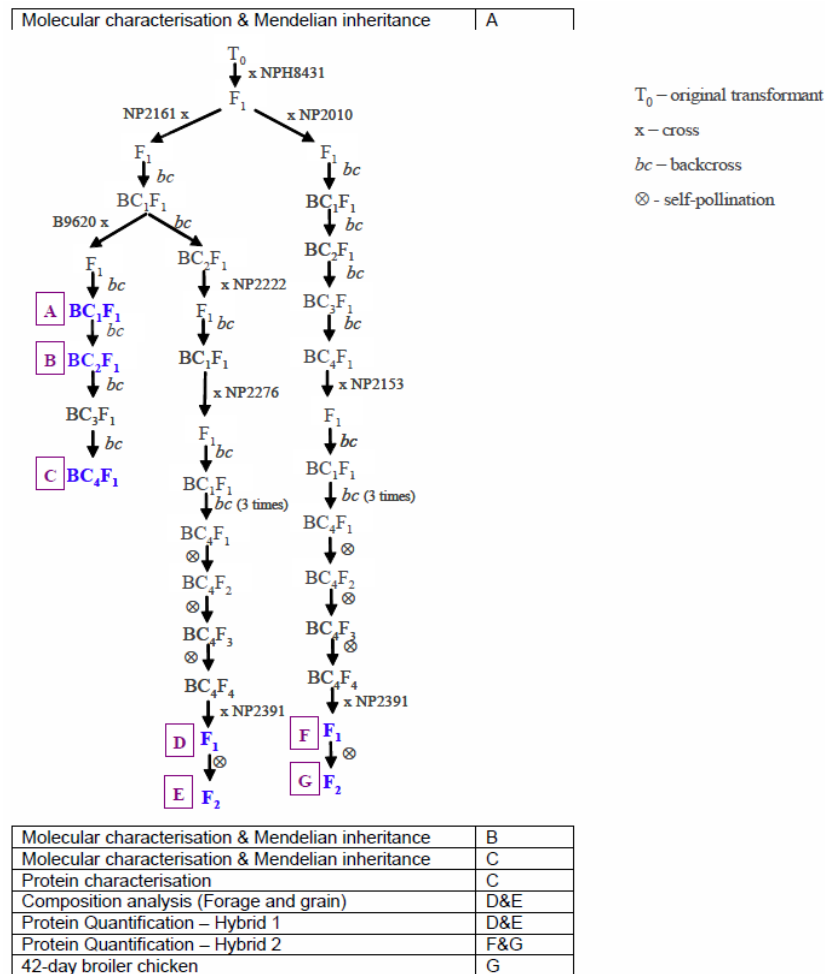
¹ BMI= Bloomington, IL, YNE= York, NE

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

I henhold til dokumentasjonen fra Syngenta er genetisk stabilitet undersøkt ved analyse av genomisk DNA fra 3 tilbakekryssingsgenerasjoner (BC1F1, BC2F1 og BC4F1). Resultatene av Southern blot-analysene viser at det rekombinante DNA-innskuddet er stabilt integrert i genomet og nedarves stabilt over generasjoner.

Fenotypisk stabilitet er vist ved analyser av proteinekspresjon i de samme tilbakekryssingsgenerasjonene. Frø fra henholdsvis BC1F1, BC2F1 og BC4F1 ble dyrket i veksthus, og evaluert for uttrykk av proteinene Vip3Aa20 og PMI (figur 3). Det ble tatt prøver av bladvev fra genotyper som var hemizygoter for begge transgenene. Prøvene ble tatt ved vekststadium V9-V11, dvs. ca 8 uker etter planting, og analysert sammen med prøver av en korresponderende nær-isogen linje. Dette for å avdekke eventuelle bakgrunnseffekter. Nivåene av begge proteinene i den transgene linjen var

tilnærmet like i de undersøkte generasjonene, og indikerer at både Vip3Aa20- og PMI-proteinet uttrykkes stabilt over generasjoner.



Figur 3. Kryssingsskjema for genmodifisert maislinje MIR162 (FSANZ 2008). Generasjoner som har inngått i analyse av genetisk stabilitet er uthevet.

Delkonklusjon

Faggruppen har vurdert de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av proteinene, og funnet at informasjonen er tilstrekkelig for en analyse av helse- og miljørisiko. Faggruppen konkluderer med at karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i MIR162 er tilfredsstillende.

2.2.3. Maislinje GA21

Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

I følge søkers dokumentasjon ble et modifisert *epsps*-gen (*mepsps*-gen) dannet ved å klonere et *epsps*-gen fra villtype-mais inn i plasmidet pDPG434 og deretter indusere to mutasjoner ved hjelp av *in vitro*-mutagenese. Mutasjonene i de kodende områder av *epsps*-genet har ført til to endringer i aminosyresekvensen, dvs i posisjon 102 (endring av threonin til isoleucin) og posisjon 106 (prolin til serin). pDPG434-plasmidet inneholder foruten andre gener også *bla*-genet, som koder for

ampicillinresistens. *Mepsps*-genet sitter på et 3,49 kilobase(kb) stort *NotI*-restriksjonsenzymfragment. Fragmentet inneholder følgende elementer: en risaktinpromoter og -intron (*r-act P+I*), et optimalisert kloroplast overføringspeptid (OTP) med genelementer fra mais og solsikke, og en nopalinsyntase 3'-ende terminatorsekvens (NOS3') fra *Agrobacterium tumefaciens*. Ampicillinresistensgenet sitter utenfor *NotI*-restriksjonsenzymfragmentet.

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

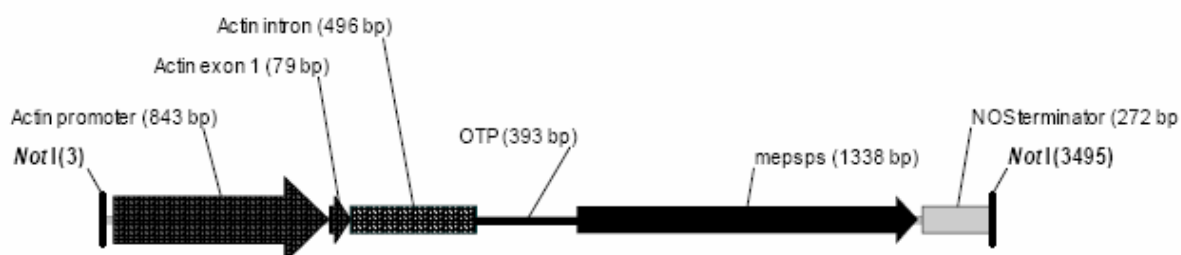
Karakterisering av geninnsettingen/genkonstruksjonen

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

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

mepsps- ekspresjonskasset

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



Figur 4. Gener og regulatoriske elementer satt inn GA21.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

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

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

Delkonklusjon

Faggruppen har tidligere vurdert karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i GA21, og de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av proteinet til å være tilfredsstillende (VKM 2006, 2009a).

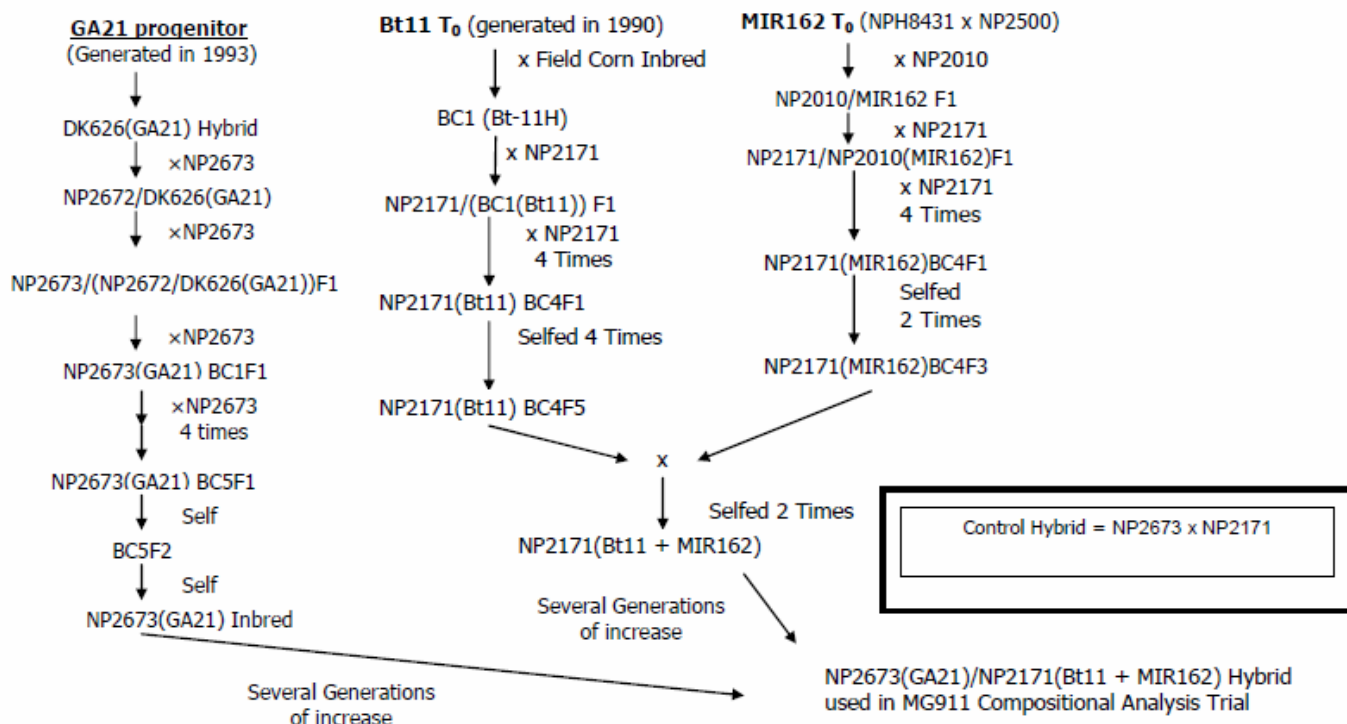
2.2.5 Hybriden Bt11 x MIR162 x GA21

Molekylær karakterisering

Hybriden Bt11 x MIR162 x GA21 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom maislinjene Bt11, MIR162 og GA21 (figur 5). Cry1Ab, Vip3Aa20-, mEPSPS-, PAT- og PMI – proteinene som uttrykkes i maiskorn og fôr er undersøkt med Southern-blot analyse. Analysene viser at de rekombinante fragmentene i planten inneholder de samme gener og genelementer som er i foreldrelinjene Bt11, MIR162, og GA21.

Analyser av enzymatisk aktivitet av PAT-, PMI og mEPSPS-proteinene, dokumentert i søknader for Bt11, MIR162 og GA21, viser ingen forskjell mellom plante- og bakterieprodusert protein. Det er vist at PAT-, PMI- og mEPSPS-proteinene fordøyes raskt i simulert mage- og tarmsaft. Fordøyelighetstester dokumentert i søknadene for Bt11 og MIR162 viser at Cry1Ab- og Vip3Aa20-proteinene fordøyes raskt i simulert magesaft. Bakterieprodusert Vip3Aa20 blir fullstendig fordøyd på under 1 minutt, mens MIR162-produsert Vip3Aa20 spaltes først til et ca. 60 kDa fragment. Dette fragmentet er fullstendig fordøyd etter 3 minutter. Cry1Ab- og Vip3Aa20-proteinene består av en proteaseresistent og en proteasefordøyelig del. I insekttarmen vil den proteasefordøyelige delen spaltes til aminosyrer, mens den resistente delen ikke blir fordøyd. I simulert tarmsaft fra mennesker fordøyes fullengde proteinene raskt. Etter 24 timer er den proteaseresistente delen av Cry1Ab proteinet spaltet i minst 3 deler. Vip3Aa20 er ikke testet i simulert tarmsaft.

Bt11 x MIR162 x GA21 Pedigree Chart – Hybrid NP2673 x NP2171 – MG911 Compositional Analysis



Figur 5. Kryssingsskjema for genmodifisert maishybrid Bt11 x MIR162 x GA21

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

Dokumentasjon fra søker inkluderer resultater fra to proteinekspresjonsstudier, henholdsvis med Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21 (Study No. BT162604GA-06-01) og Bt11 x MIR162 x GA21 (Study No. BT162GA-06-01).

Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21

Maishybriden Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21 ble evaluert i feltforsøk på Syngentas forskingsstasjon i Illinois, USA vekstsesongen 2006. Forsøket ble lagt ut som et fullstendig randomisert blokkdesign med 5 gjentak. Forsøkene inkluderte foruten testlinjen, foreldrelinjene Bt11, MIR162, MIR604 og GA21, samt en ikke-transgen, nær-isogen kontrollinje (NP2674/NP2171).

Ekspressjonen av Cry1Ab-, PAT-, Vip3Aa20-, mCry3-, PMI- og mEPSPS-proteinene ble målt ved hjelp av Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) i ulike plantevev og på ulike vekststadier. Konsentrasjonen av de aktuelle proteinene ble målt i blad, røtter, pollen og hel plante ved blomstring, mens det ble tatt prøver av frø ved fysiologisk modning. På grunn av stor likhet mellom PMI-proteinene i MIR162 og MIR604 var det ikke mulig å skille mellom disse proteinene i analysene av Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21. Det ble derfor kun målt totalkonsentrasjoner av PMI i hybridene.

De høyeste nivåene av Cry1Ab-proteinet ble funnet i blad ved blomstring (29,7 µg/g t.v.). Detekterbare konsentrasjoner av proteinet ble også påvist i røtter, hel plante, pollen og frø (tabell 5). Uttrykket av Cry1Ab i pollen var imidlertid lavt (0,08 µg/g t.v.). Det ble påvist PAT-protein i blad, røtter og hel plante, men proteinet ble ikke detektert i verken frø eller pollen. Vip3Aa20-proteinet var til stede i alle undersøkte plantevev. Høyest konsentrasjon ble målt i blad ved blomstring (187,2 µg/g t.v.). Det gjennomsnittlige nivået av proteinet i frø ble målt til 140,1 µg/g t.v. (variasjonsområde

89,74-164,69). Med unntak av pollen, ble det detektert mCry3A i alle vevstyper, med høyest konsentrasjon i blad (31 µg/g t.v. (variasjonsområde 24,37-47,44 µg/g t.v.). mEPSPS ble detektert i alle undersøkte plantevev, med høyest konsentrasjon i pollen (89,9 µg/g t.v., variasjonsområde 73,12-129,61 µg/g t.v.). PMI-proteinet ble påvist i blad, røtter, hel plante, pollen og frø. Høyest konsentrasjon ble funnet i pollen (48,07 µg/g t.v.).

Konsentrasjonen av proteinene Cry1Ab, PAT, Vip3Aa20, mCry3 og mEPSPS i hybridene Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21 ble i hovedsak funnet å være sammenlignbare med nivåene i de respektive foreldrelinjene (tabell 5). Det ble imidlertid påvist signifikant ($p < 0,05$) lavere nivå av Cry1Ab-protein i frø fra hybridene sammenlignet med nivået i Bt11 (CBI Appendix 7). Tilsvarende viste analysene signifikant ($p < 0,05$) høyere konsentrasjon av mCry3A i prøver av hel plante hos foreldrelinjen MIR604 sammenlignet med Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21. Konsentrasjonen av PMI-proteinet i Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21 var som forventet høyere enn foreldrelinjene, men tilsvarer totalkonsentrasjonen i begge foreldrelinjene (tabell 5.)

Bt11 x MIR162 x GA21

Tilsvarende feltforsøk ble utført med hybridlinjen Bt11 x MIR162 x GA21 på Syngentas forskingsstasjon i 2006. I dette forsøket ble uttrykket av Cry1Ab-, PAT, Vip3Aa20, PMI og mEPSPS-protein undersøkt i hybridene, foreldrelinjene Bt11, MIR162 og GA21, samt en umodifisert, nær-isogen kontrollinje. Resultater fra analyser av plantevev ekstrahert fra blad, røtter, pollen og hel plante ved blomstringsstadiet og frø ved modning er vist i tabell 6. I tillegg viser søkers dokumentasjon (CBI Appendix 8) at proteinkonsentrasjon i blad og røtter også er målt på et tidligere og seinere vekststadium (V6 og fysiologisk modning). Det ble også analysert prøver av hel plante ved modning og visning.

Resultatene av analysene viser at konsentrasjonen av proteinene Cry1Ab, PAT, Vip3Aa20, PMI og mEPSPS i hybridlinjen Bt11 x MIR162 x GA21 i hovedsak er sammenlignbare med nivåene i de respektive foreldrelinjene. Det ble imidlertid påvist signifikant ($p < 0,05$) høyere nivå av Cry1Ab-protein i blad fra hybridene sammenlignet med nivået i Bt11 ved stadium V6. (Appendix 8). Videre viser søkers dokumentasjon signifikant lavere konsentrasjoner av Cry1Ab i røtter og PAT i hel plante ved blomstring. Det påpekes også at nivået av Vip3Aa20 og mEPSPS var signifikant ($p < 0,05$) høyere i pollen fra Bt11 x MIR162 x GA21 sammenlignet med de respektive foreldrelinjene MIR162 og GA21 (tabell 6).

Generelt vil flere genkonstruksjoner samlet i en plante, kunne forsterke effekten av opp- og nedregulering av plantens egne gener ved innsetting av fremmed DNA (se Filipecki & Malepszy 2006, Albo *et al.* 2007).

Flankerende sekvenser til de rekombinante DNA-fragmentene i Bt11 x MIR162 x GA21 er ikke sekvensert. Siden Bt11 x MIR162 x GA21 er fremkommet ved konvensjonell kryssing mellom Bt11, MIR162, og GA21 hevder Syngenta at sekvensene i og rundt de respektive fragmentene er uendret. Det er ikke foretatt analyser av åpne leserammer for Bt11 x MIR162 x GA21.

Tabell 5. Gjennomsnittlige konsentrasjoner og variasjonsområde for proteinene Cry1Ab, PAT, Vip3Aa20, PMI (fra MIR162), MIR604PMI, mCry3A og mEPSPS i testlinjen Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21 og foreldrelinjer i ulike plantevev (µg/g t.v.). Fra forsøk i USA i 2006.

N/A – indicate instances where proteins were not analysed								
Tissue type (Stage)	Hybrid	Cry1Ab	PAT	Vip3Aa20	mCry3A	PMI Measured with the PMI Reference Protein	MIR604 PMI Measured with the MIR604 PMI Reference Protein	mEPSPS
Leaves (Anthesis)	Event	30.7 25.78–35.16	0.596 0.50–0.82	182.4 136.91–279.52	37.0 30.72–46.44	7.72 6.54–9.20	5.03 3.77–6.13	49.6 40.33–59.68
	Stack	29.7 22.00–38.64	0.603 0.46–0.76	187.2 132.81–259.25	31.0 24.37–47.44	16.27 11.82–19.83	9.95 7.48–14.01	43.3 26.52–57.66
Roots (Anthesis)	Event	11.5 9.56–13.27	0.905 0.50–1.14	52.1 36.03–65.91	22.6 16.40–25.40	2.58 1.94–3.33	2.41 1.71–3.08	15.8 10.32–23.5
	Stack	11.3 7.33–13.53	0.739 0.58–0.99	53.1 38.65–65.80	25.4 16.96–31.63	5.37 4.27–6.82	4.08 2.98–5.67	13.4 8.82–17.85
Pollen (Anthesis)	Event	0.0764 0.07–0.09	<LOD-<LOD <LOD-<LOD	97.2 82.19–117.58	<LOD-<LOD <LOQ-<LOQ	5.07 4.72–5.24	43.32 37.39–47.77	86.1 64.01–113.66
	Stack	0.0801 0.06–0.12	<LOD-<LOD <LOD-<LOD	85.4 74.64–95.92	<LOD-<LOD <LOQ-<LOQ	48.07 46.14–49.76	50.40 41.00–58.21	89.9 73.12–129.61
Kernels (Physiological Maturity)	Event	1.782 1.19–2.31	<LOD-<LOD <LOQ-<LOQ	123.8 54.25–165.94	0.717 0.19–1.11	2.48 1.08–3.16	2.33 1.55–2.99	5.34 3.62–7.61
	Stack	1.573 1.15–2.52	<LOD-<LOD <LOQ-<LOQ	140.1 89.74–164.69	0.620 0.40–0.77	5.18 ± 1.27 3.38–6.54	4.74 1.19–5.94	5.92 2.99–7.69
Whole Plant (Anthesis)	Event	15.93 13.63–18.42	0.912 0.71–1.26	73.0 56.66–87.55	18.1 14.54–21.54	3.87 3.02–4.62	4.37 3.51–5.54	23.1 19.58–25.64
	Stack	15.21 13.65–17.12	0.873 0.75–1.03	72.6 57.05–87.52	16.2 12.72–21.00	8.54 7.52–9.53	7.20 6.16–8.78	21.9 19.27–25.31

Tabell 6. Gjennomsnittlige konsentrasjoner og variasjonsområde for proteinene Cry1Ab, PAT, Vip3Aa20, PMI og mEPSPS i testlinjen Bt11 x MIR162 x GA21 og foreldrelinjer i ulike plantevev (µg/g t.v.). Fra forsøk i USA i 2006.

Tissue type (Stage)	Hybrid	Cry1Ab	PAT	Vip3Aa20	PMI	mEPSPS
Leaves (Anthesis)	Event	33.7 30.22–40.12	0.657 0.51–0.81	133.2 112.36–154.79	6.74 6.03–7.41	34.8 30.39–40.44
	Stack	32.7 21.86–40.39	0.629 0.48–0.97	139.9 116.71–187.47	7.44 6.39–8.76	34.1 28.86–39.59
Roots (Anthesis)	Event	12.8 10.33–15.53	0.580 0.35–0.79	32.0 9.54–51.60	2.03 1.45–3.65	14.8 11.81–18.98
	Stack	11.9 9.17–14.45	0.403 0.31–0.47	28.4 19.07–38.45	2.15 1.54–3.18	12.8 10.68–15.44
Pollen (Anthesis)	Event	0.0636 0.06–0.07	<LOD-<LOD <LOD-<LOD	107.6 103.72–111.18	4.62 4.25–5.30	102.4 65.79–116.33
	Stack	0.0858 0.05–0.15	<LOD-<LOD <LOD-<LOD	157.0 138.53–173.94	4.79 4.41–5.30	131.8 103.15–144.19
Kernels (Physiological Maturity)	Event	6.91 4.35–10.67	<LOD-<LOD <LOD-<LOD	83.8 56.41–108.27	1.84 1.11–2.58	6.57 5.35–8.76
	Stack	4.79 4.85–10.64	<LOD-<LOD <LOD-<LOD	83.8 59.18–102.10	1.77 1.21–2.61	6.76 3.53–8.57
Whole Plant (Anthesis)	Event	19.6 16.15–22.72	0.872 0.66–1.08	80.4 64.92–102.64	3.94 3.56–4.42	46.7 35.65–62.96
	Stack	17.8 13.91–20.42	0.751 0.65–0.86	79.0 67.56–86.51	3.94 3.52–4.22	46.4 36.64–54.73

N/A – indicate instances where proteins were not analysed

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

Southern blot av DNA fra Bt11 x MIR162 x GA21 viser at de rekombinante DNA-fragmentene fra henholdsvis Bt11, MIR162 og GA21 er stabilt integrerte i hybridlinjen. Detaljer av de komparative Southern blot-analysene av foreldrelinjene og hybridene er imidlertid klassifisert som konfidensiell informasjon av Syngenta. Når det gjelder genetisk stabilitet viser også søker til molekylærbiologiske analyser av de respektive foreldrelinjene, som bekrefter at de rekombinante innskuddene er stabilt integrert i genomet i hver enkelt event.

Tilsvarende henviser Syngenta Crop Production til tidligere søknader relatert til foreldrelinjene med hensyn på fenotypisk stabilitet. Søker viser til at hybridene er resultat av konvensjonelle kryssinger, og at F₂-generasjonen som høstes, kun skal benyttes til mat, fôr og industriell prosessering, og ikke benyttes som såfrø eller inngå i videre foredlingsarbeid. *I følge EFSA's retningslinjer vedrørende risikovurdering av GMP med stabile egenskaper (EFSA 2007), anbefales det at sammenligningen av de innsatte genkonstruksjonene i foreldrelinjene og den transgene hybridene foretas på representative materialer for det som skal benyttes i den kommersielle produksjonen, dvs. inngår i mat/fôrkjeden og/eller settes ut i miljøet).*

Delkonklusjon

Hybridene Bt11 x MIR162 x GA21 er dannet ved konvensjonelle kryssinger mellom maislinjene Bt11, MIR162 og GA21. Southern-analyser indikerer at antall, struktur og organisering av de innsatte genkonstruksjonene i maishybridene er ekvivalent med de som finnes i de respektive foreldrelinjene. Søker har ikke undersøkt stabilitet over generasjoner.

Nivåene av Cry1Ab, PAT, Vip3Aa20 og mEPSPS-proteiner i vegetativt vev og frø er i hovedsak i overensstemmelse med uttrykk av tilsvarende proteinprodukter i de respektive foreldrelinjene. Ønsker FG3 at signifikante forskjeller mellom hybrid og foreldrelinjer skal kommenteres?

Faggruppen har vurdert de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av proteinene og finner at informasjonen er tilstrekkelig. Faggruppen konkluderer med at informasjonen er tilstrekkelig for vurdering av helse- og miljørisiko knyttet til bruk av maishybridene.

3. Komparative analyser

3.1. Forsøksdesign og valg av komparator

Dokumentasjonen fra Syngenta knyttet til søknad EFSA/GMO/DE/2009/66 og EFSA/GMO/DE/2009/67 inkluderer analyser av ernæringsmessige viktige komponenter av de transgene maislinjene Bt11 x MIR162 x GA21 (Study No. BT162GA-06-101) og Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21 (Study No. BT162604GA-06-101). Begge maishybridene ble testet i felt i USA vekstsesongen 2006.

Bt11 x MIR162 x GA21

Feltforsøkene var lokalisert på 10 ulike steder i sentrale dyrkingsområder for mais i USA (Iowa, Indiana, Illinois, Minnesota og Nebraska). I tillegg til testlinjen Bt11 x MIR162 x GA21 ble det benyttet en korresponderende, umodifisert nær-isogen hybridlinje (NP2673 x NP2171) som kontroll. I henhold til søker har kontrolllinjen tilnærmet samme genetiske bakgrunn som den transgene hybridene, men inneholder ikke de rekombinante DNA-fragmentene og uttrykker ikke Cry-, Vip-, mEPSPS-, PAT- og PMI-proteiner. Forsøkene inkluderte ikke kommersielle maissorter som referansemateriale. Ved sammenligning av normalt variasjonsområde hos konvensjonelle maissorter for de enkelte ernæringskomponentene har søker benyttet ILSI Crop Composition Database (ILSI 2007).

Feltforsøkene ble lagt ut som fullstendig randomiserte blokkdesign med 3 gjentak. I henhold til søkers dokumentasjon ble forsøksruter med testlinjen behandlet med herbicidene glyfosat og glufosinat-

ammonium. I tillegg ble det benyttet konvensjonelle sprøyteprogram for å opprettholde optimal plantehele. Det ble tatt fôrprøver fra alle 3 blokkene, 5 planter fra hver genotype. Prøvetakingen ble foretatt på normalt høstetidspunkt for fôrmais, d.v.s. deigmodningsstadiet (R4). Når plantene var fysiologisk modne (utviklingsstadium R6) ble det høstet kolber fra 15 planter fra hvert gjentak for videre frøanalyser.

Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21

I henhold til søkers dokumentasjon var feltforsøkene med maishybriden Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21 lokalisert samme steder som Bt11 x MIR162 x GA21-forsøket. Den umodifiserte maishybriden NP2673 x NP2171 ble benyttet som kontroll-linje i forsøkene. Det ble benyttet tilsvarende forsøksdesign og – metodikk som beskrevet over i studien BT162GA-06-101.

Statistiske analyser

I Nordisk ministerråds rapport "Safety Assessment of Novel Food Plants: Chemical Analytical Approaches to the Determination of Substantial Equivalence" (TemaNord 1998), anbefales det at tilstrekkelig antall prøver må analyseres for å få adekvat sensitivitet for statistisk analyse. Spredning i enkeltparametre skal være sammenlignbare for genetisk modifisert plante og umodifisert plante. I rapporten er det anbefalt at spredningen i enkeltverdier bør ligge innenfor $\pm 20\%$. Faggruppe for genmodifiserte organismer benytter denne anbefalingen som grunnlag for vurdering av forsøksresultatene.

3.2. Analyser av ernæringsmessige komponenter

Hovedkomponenter i mais

OECDs konsensusdokument for mais er fulgt med hensyn på valg av analyseparametre for maishybriden Bt11 x MIR162 x GA21 og kontrollhybrid.

Fôrfraksjonen er analysert for innhold av aske, fett, protein, vann, ADF (acid detergent fibre), NDF (neutral detergent fibre), fosfor, kalsium og karbohydrater. I korn ble følgende parametre analysert; protein, fett, aske, vann, karbohydrater, ADF, NDF, aminosyrer, fettsyrer (linol-, olje-, palmitin-, stearin- og linolensyre), fosfor, jern, kalium, kalsium, kobber, magnesium, mangan, natrium, selen, sink, vitaminene B1, B2, B3, B6, E, folinsyre og β -karoten, de sekundære metabolittene furfural, ferulsyre og p-kumarinsyre, og anti-næringsstoffene fytinsyre, inositol, trypsinhemmer og raffinose. Analysene ble utført under god laboratoriepraksis (GLP).

Analyser av fôrfraksjon

Det ble ikke funnet statistisk signifikante forskjeller for komponentene protein, aske, ADF, NDF, kalsium og vann i fôr. For fosfat og karbohydrat ble det imidlertid påvist signifikante statistiske forskjeller (tabell merket Table 3). Forskjellene som er målt er mindre enn 20 %, og verdiene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2007).

Table 3. Proximate composition of forage from Bt11 x MIR162 x GA21 maize and nontransgenic maize

Proximate levels shown in % DW, except for moisture (% FW). Results significant at $P < 0.05$ are shown in bold italic type. For across location analyses $N = 18$; for individual location means $N = 3$.

Location	Data source	Statistic	Moisture (% FW)	Protein (% DW)	Fat (% DW)	Ash (% DW)	Carbo- hydrates (% DW)	ADF (% DW)	NDF (% DW)
Across all	Bt11 x MIR162 x GA21	mean	72.87	8.38	2.07	4.57	84.97	24.63	39.27
		SD	2.29	0.62	0.72	1.02	1.43	2.79	4.88
	Nontransgenic	mean	71.30	8.63	2.48	5.02	83.89	24.58	38.98
		CV	3.2%	7.3%	31.8%	21.3%	1.7%	11.3%	12.5%
ANOVA (F test)									
	Genotype effect	<i>P</i>	0.098	0.253	0.114	0.206	0.043	0.958	0.862
	Location-by-genotype interaction	<i>P</i>	0.505	0.962	0.355	0.455	0.570	0.474	0.521

Location	Data source	Statistic	Ca	P
Across	Bt11 x MIR162 x GA21	mean	2541	2078
all	Nontransgenic	mean	2516	2228
		SD	542	189
		CV	21.4%	8.8%
		ANOVA (F test)		
	Genotype effect	P	0.890	0.035
	Location-by-genotype interaction	P	0.625	0.353

Analyser av maiskorn

I henhold til søkers dokumentasjon er følgende komponenter analysert: aske, fett, protein, vann, karbohydrater, ADF, NDF og stivelse (se tabell merke Table 5). Med unntak for protein (g x e-samspill) viser kombinerte analyser over lokaliteter ingen statistisk signifikante forskjeller mellom den transgene linjen og kontroll for de analyserte komponentene. Verdiene for disse komponentene ligger innenfor toleranseintervallene for referansesortene som inngikk i studien og innenfor typiske verdier som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2007).

Table 5. Proximate composition of grain from Bt11 x MIR162 x GA21 maize and nontransgenic maize

Proximate levels shown in % DW, except moisture (% FW). Results significant at $P < 0.05$ are shown in bold italic type. For across location analyses $N = 18$; for individual location means $N = 3$.

Location	Data source	Statistic	Moisture	Protein	Fat	Ash	Carbo- hydrates	ADF	NDF	TDF	Starch
Across	Bt11 x MIR162 x GA21	mean	9.48	10.86	4.24	1.54	83.35	3.52	11.24	18.12	66.28
all	Nontransgenic	mean	9.47	11.17	4.17	1.52	83.13	3.26	11.01	18.28	64.01
		SD	0.40	0.43	0.35	0.14	0.54	0.68	1.63	1.56	6.26
		CV	4.3%	3.9%	8.4%	9.2%	0.6%	20.0%	14.7%	8.6%	9.6%
		ANOVA (F test)									
	Genotype effect	P	– ^a	0.053	0.551	0.730	0.241	0.279	0.675	0.771	0.297
	Location-by-genotype interaction	P	– ^a	0.050	0.941	0.498	0.108	0.521	0.968	0.665	0.820

Fettsyresammensetning i mais

Fettsyresammensetningen for Bt11 x MIR162 x GA21 er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Det ble analysert for innhold av 5 fettsyrer. Resultatene av variansanalysen (ANOVA) mellom transgen hybrid og kontroll viser statistisk signifikante forskjeller for linolje-, olje- og stearinsyre, se tabell merket Table 9. For linoljesyre er det også påvist statistisk signifikant forskjell genotype x sted-samspill. Forskjellene som er målt er mindre enn 20 %, og verdiene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2007).

Table 9. Fatty acid^a composition of grain from Bt11 x MIR162 x GA21 maize and nontransgenic maize

Fatty acids shown as % of total fatty acid. Results significant at $P < 0.05$ are shown in bold italic type. For across location analyses $N = 18$; for individual location means $N = 3$.

Location	Data source	Statistic	16:0 Palmitic	18:0 Stearic	18:1 Oleic	18:2 Linoleic	18:3 Linolenic
Across	Bt11 x MIR162 x GA21	mean	13.98	1.68	25.82	55.88	1.67
all	Nontransgenic	mean	13.99	1.76	27.43	54.22	1.64
		SD	0.24	0.04	0.37	0.34	0.05
		CV	1.7%	2.2%	1.4%	0.6%	3.3%
		ANOVA (F test)					
	Genotype effect	P	0.968	<0.001	<0.001	<0.001	0.094
	Location-by-genotype interaction	P	0.172	0.145	0.066	0.011	0.594

Aminosyrer i mais

I henhold til søkers dokumentasjon er det analysert for totalt 18 essensielle og ikke-essensielle aminosyrer. Valget av analyseparametere er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument. Resultatene av variansanalysen (ANOVA) viser ingen statistisk signifikante forskjeller for aminosyrene cystein, lysin, metionin og tryptofan. For de øvrige aminosyrene ble det funnet statistisk signifikante forskjeller (tabell merket Table 8). Det er ikke påvist statistisk signifikant forskjell i genotype x sted-samspill for noen av aminosyrene. Alle verdiene ligger innenfor de typiske verdiene som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2007).

Table 8. Amino acid composition of grain from Bt11 x MIR162 x GA21 maize and nontransgenic maizeAmino acid levels shown in mg/g DW. For across location analyses $N = 18$; for individual location means $N = 3$.

Location	Data source	Statistic	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val
Across all	Bt11 x MIR162 x GA21	mean	6.86	3.69	5.28	20.23	9.53	4.02	7.84	2.33	5.10
		mean	7.05	3.83	5.48	21.08	9.96	4.12	8.19	2.36	5.30
	Nontransgenic	SD	0.2	0.14	0.22	0.88	0.40	0.13	0.35	0.10	0.21
		CV	3.3%	3.8%	4.0%	4.2%	4.1%	3.2%	4.3%	4.3%	4.1%
ANOVA (F test)											
	Genotype effect	<i>P</i>	0.029	0.010	0.017	0.014	0.007	0.038	0.010	0.374	0.016
	Location-by-genotype interaction	<i>P</i>	0.124	0.315	0.567	0.495	0.606	0.105	0.606	0.571	0.191
Location	Data source	Statistic	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg	Trp
Across all	Bt11 x MIR162 x GA21	mean	2.26	3.63	13.09	3.10	5.40	3.21	2.99	4.67	0.722
		mean	2.33	3.82	13.79	3.51	5.70	3.26	3.07	4.90	0.716
	Nontransgenic	SD	0.13	0.17	0.72	0.44	0.24	0.14	0.10	0.27	0.064
		CV	5.5%	4.6%	5.4%	13.3%	4.4%	4.3%	3.2%	5.6%	8.9%
ANOVA (F test)											
	Genotype effect	<i>P</i>	0.118	0.006	0.013	0.016	0.003	0.269	0.027	0.024	0.797
	Location-by-genotype interaction	<i>P</i>	0.972	0.273	0.729	0.518	0.413	0.142	0.079	0.345	0.605

Vitaminer

I henhold til OECDs konsensusdokument for mais bør følgende vitaminer analyseres: A, B1, B2, B6, C, E, folat og niacin. I følge dokumentasjonen fra søker er ikke innholdet av vitamin C målt. Vitamin A er målt som β -karoten. For vitamin A, B1, B6 og niacin er det funnet statistisk signifikante forskjeller mellom test- og kontrollinje, se tabell merket Table 7. Det ble videre påvist statistisk signifikant forskjell i genotype x sted-samspill for vitamin A. Verdiene ligger imidlertid innenfor typiske verdier som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2007). Sukkermais er ansett som en god C-vitaminskilde (Warman & Havard 1998).

Table 7. Vitamin composition of grain from Bt11 x MIR162 x GA21 maize and nontransgenic maizeVitamin levels shown in mg/100 g except for vitamin E (mg/g). Results significant at $P < 0.05$ are shown in bold italic type. For across location analyses $N = 18$; for individual location means $N = 3$.

Location	Data source	Statistic	Vitamin A β -carotene	Vitamin B ₁ Thiamine	Vitamin B ₂ Riboflavin	Vitamin B ₃ Niacin	Vitamin B ₆ Pyridoxine	Vitamin B ₉ Folic Acid	Vitamin E ^a α -tocopherol
Across all	Bt11 x MIR162 x GA21	mean	0.113	0.458	0.203	2.86	0.649	0.0297	0.0080
		mean	0.108	0.442	0.198	2.59	0.713	0.0277	0.0086
	Nontransgenic	SD	0.005	0.017	0.036	0.25	0.054	0.0063	0.0010
		CV	4.9%	3.9%	18.0%	9.3%	8.0%	21.9%	12.1%
ANOVA (F test)									
	Genotype effect	<i>P</i>	0.012	0.017	0.697	0.008	0.004	0.356	0.105
	Location-by-genotype interaction	<i>P</i>	0.017	0.420	0.127	0.520	0.141	0.829	0.436

Mineraler

Innholdet av mineraler er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Innholdet av natrium og selen var lavere enn påvisningsgrensen både i umodifisert og modifisert mais. For kobber ble det funnet statistisk signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll, mens det ble påvist

statistisk signifikant forskjell i genotype x sted-samspill for fosfat, kalium, kobber, mangan og magnesium, se tabell merket Table 6. Det er ikke funnet statistisk signifikante forskjeller for andre analyserte mineraler. De statistiske forskjellene som er påvist er lavere enn 20 %, og alle verdiene ligger innenfor typiske verdier som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2007).

Table 6. Mineral composition of grain from Bt11 x MIR162 x GA21 maize and nontransgenic maize

Mineral levels shown in mg/kg DW. Results significant at $P < 0.05$ are shown in bold italic type. For across location analyses $N = 18$; for individual location means $N = 3$.

Location	Data source	Statistic	Ca	Cu	Fe	Mg	Mn	P	K	Se ^a	Na ^b	Zn
Across all	Bt11 x MIR162 x GA21	mean	44.4	1.58	28.3	1323	6.61	3543	3994	< LOQ-0.399	< LOQ-128	25.8
	Nontransgenic	mean	45.9	1.30	29.1	1339	6.46	3611	3941	< LOQ-0.418	< LOQ	26.1
		SD	2.3	0.07	1.6	52	0.28	116	111	–	–	1.4
		CV	5.0%	5.1%	5.4%	3.9%	4.2%	3.3%	2.8%	–	–	5.5%
	ANOVA (F test)											
	Genotype effect	<i>P</i>	0.061	<0.001	0.129	0.356	0.127	0.104	0.170	–	–	0.332
	Location-by-genotype interaction	<i>P</i>	0.459	0.021	0.057	0.017	0.003	0.004	0.036	–	–	0.088

Sekundære metabolitter og antiernæringsstoffer

Sekundære metabolitter og antiernæringskomponenter er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Det ble funnet statistisk signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll for kumarsyre og fytinsyre, samt genotype x sted-samspill for kumarsyre og inositol (tabell merket Table 10). Mengdene av raffinose og furfural var lavere enn påvisningsgrensen. Verdiene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2007).

Table 10. Secondary metabolite and antinutrient composition of grain from Bt11 x MIR162 x GA21 maize and nontransgenic maize

Analyte units as in column heading. For across location analyses $N = 18$; for individual location means $N = 3$.

Location	Data source	Statistic	Ferulic acid (mg/kg DW)	<i>p</i> -Coumaric acid (mg/kg DW)	Inositol (ppm DW)	Phytic acid (% DW)	Trypsin inhibitor (TIU/mg DW)	Furfural ^a (mg/kg DW)	Raffinose ^b (% DW)
Across all	Bt11 x MIR162 x GA21	mean	1866	123	2678	0.759	1.79	< LOQ	< LOQ-0.167
	Nontransgenic	mean	1881	130	2767	0.838	1.70	< LOQ	< LOQ-0.162
		SD	117	9	291	0.095	0.27	–	–
		CV	6.2%	6.8%	10.7%	11.8%	15.3%	–	–
	ANOVA (F test)								
	Genotype effect	<i>P</i>	0.706	0.029	0.378	0.028	0.352	–	–
	Location-by-genotype interaction	<i>P</i>	0.110	0.012	0.027	0.105	0.789	–	–

3.3. Agronomiske egenskaper

I følge dokumentasjon fra Syngenta er det ikke foretatt analyser av maishybriden Bt11 x MIR162 x GA21 med hensyn på agronomiske karakterer. Søker viser til feltforsøk med hybrid Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21 (søknad EFSA/GMO/UK/2009/66). I følge Syngenta er bruk av Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21 som testlinje i henhold til EFSA's retningslinjer for risikovurdering av hybrider med 'stablede egenskaper': "As long as each event in the highest number of stacked events has been risk assessed, the risk assessment of the stacked events might also be applicable to GM stacks containing fewer of these events" (EFSA 2007).

Hybridlinjen Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21 ble testet i en serie feltforsøk i USA i vekstsesongen 2006. Forsøkene var lokalisert på 10 ulike steder i sentrale dyrkingsområder for mais i USA (Iowa, Indiana, Illinois, Wisconsin, South Dakota, Minnesota og Nebraska). I disse forsøkene ble det i tillegg til en testhybridlinje av Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21, også benyttet en korresponderende, umodifisert nær-isogen hybridlinje (NP2673 x NP2171) som kontroll. I henhold til søker har

kontrollinjen tilnærmet samme genetiske bakgrunn som den transgene hybriden, men inneholder ikke de rekombinante DNA-fragmentene og uttrykker ikke Cry-, Vip-, mEPSPS-, PAT- og PMI-proteiner. Forsøkene inkluderte ikke kommersielle referansesorter.

Forsøksfeltene ble lagt ut som fullstendig randomiserte blokkdesign med 5 gjentak pr. lokalitet. I søkers dokumentasjon vises det til at det er gjennomført normal ugrasbekjempelse, men det går ikke eksplisitt fram av dokumentasjonen om forsøksruter med testlinjen Bt11 x MIR162 x GA21 ble behandlet med herbicidene glyfosat og glufosinat. I henhold til EFSA's retningslinjer for risikovurdering av GMP (EFSA 2006) skal feltforsøk med herbicidtolerante sorter inkludere både ubehandlede blokker og blokker sprøytet med tiltenkt herbicid(er) (se 09/309).

Det ble foretatt registreringer av til sammen 19 agronomiske og morfologiske karakterer knyttet til reproduksjon, spredning og vegetativ vekst. Søker oppgir både praktiske og ressursmessige årsaker til at ikke alle parameterne registrert på samtlige forsøkssteder. En stor del dokumentasjonen knyttet til agronomiske karakterer er klassifisert som konfidensiell informasjon. Syngenta presenterer resultater fra registreringer av karakterer som frøplantevitalitet, tidlighet, plantetetthet, plantehøyde, vekstrate, kolbelengde, tap av kolber, andel sterile planter, legde, frøavling og sjukdomsresistens.

Det er foretatt statistiske analyser innen lokaliteter og kombinerte analyser over lokaliteter for den enkelte karakter. Variansanalysene over forsøkssteder viste, med unntak av testvekt¹ og vanninnhold ved høsting, ingen statistisk signifikante forskjeller ($p \geq 0,05$) mellom Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21 og den umodifiserte, nær-isogene kontrollinjen (tabell 6). Søker kommenterer dette med at forskjellene er små og ikke biologisk signifikante. Dette fordi det ikke er påvist forskjeller i total frøavling mellom hybridene (tabell 7).

Statistiske analyser innen lokaliteter viste signifikante forskjeller ($p \leq 0,05$) for frøavling på 4 av de 10 forsøksstedene ($p < 0,05$) (tabell 7). På 3 av lokalitetene ble det registrert høyere frøavling hos den transgene hybridene sammenlignet med kontroll.

Tabell 7. Resultater fra variansanalyse over steder for agronomiske karakterer for testlinjen Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21 og umodifisert, nær-isogen kontroll.

Trait	Trial Year	Locations	Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21 Hybrid			Control Hybrid			Difference	Prob. > F-value	Significance [†]
			N	Mean	SE of mean	N	Mean	SE of mean			
% EMERGED PLANTS	2006	8	37	88.1	0.75	36	85.9	0.76	2.2	6.6%	NS
EARLY GROWTH	2006	8	40	2.6	0.15	40	3.1	0.15	-0.5	9.3%	NS
EAR HEIGHT	2006	9	45	105	0.5	45	106	0.5	-1	50.0%	NS
% GRAIN MOISTURE	2006	10	49	17.6	0.20	50	18.3	0.20	-0.7	2.8%	*
PLANT POPULATION AT HARVEST	2006	10	49	31264	104.5	50	31005	103.5	259	11.0%	NS
HEAT UNITS TO 50% SILKING	2006	8	40	1255	3.2	40	1254	3.2	1	89.0%	NS
HEAT UNITS TO 50% POLLEN SHED	2006	8	40	1245	1.9	40	1242	1.9	3	38.0%	NS
PLANT HEIGHT	2006	9	45	238	1.7	45	237	1.7	1	55.0%	NS
TEST WEIGHT	2006	8	39	56.3	0.29	40	57.3	0.28	-1.0	4.0%	*

[†] * = F-test was significant and NS = F-test was not significant at the customary 5% level

Tabell 8. Resultater fra variansanalyser over og innen steder for frøavling (bushels/acre) for test- og kontrollinjen.

Location (City, State)	Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21 Hybrid			Control Hybrid			Difference	Prob. > F Value	Significance [†]
	N	Grain Yield at Standard Moisture (bu/ac)	SE of mean	N	Grain Yield at Standard Moisture (bu/ac)	SE of mean			
Brookings, SD	5	151.2	4.79	5	155.4	4.79	-4.2	56.3%	NS
Gaylord, MN	5	182.3	5.51	5	206.7	5.51	-24.4	3.5%	*
Janesville, WI	5	157.2	4.53	5	153.6	4.53	3.6	59.5%	NS
Maxwell, IA	4	170.1	2.02	5	159.7	1.80	10.4	3.2%	*
Monroeville, IN	5	172.9	5.05	5	164.6	5.05	8.3	30.5%	NS
Seward, NE	4	207.6	5.28	5	178.2	4.72	29.4	3.3%	*
El Paso, IL	5	218.8	6.91	5	193.4	6.91	25.4	5.98%	NS
Bloomington, IL	5	210.4	4.12	5	187.8	4.12	22.6	1.78%	*
Sadorus, IL	5	189.8	4.68	5	183.1	4.68	6.7	36.6%	NS
Mackinaw, IL	5	209.5	5.74	5	181.7	5.74	27.8	2.7%	*
Average	48	187.0	3.82	50	176.4	3.74	10.6	7.7%	NS

[†] * = F-test was significant and NS = F-test was not significant at the customary 5% level

3.4. Delkonklusjon

Analyser av ernæringsmessige komponenter er i hovedsak utført i tråd med OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002). Det er påvist signifikante forskjeller mellom maishybrid Bt11 x MIR162 x GA21 og kontroll i enkeltparametere. Verdiene for de analyserte komponentene ligger imidlertid innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen, samt innenfor toleranseintervallene for de umodifiserte referansesortene som er inkludert i søkers dokumentasjon.

Faggruppen påpeker at søker ikke har foretatt analyser av vitamin C. Det understrekes at konsensusdokumentet i størst mulig grad skal følges når det legges fram dokumentasjon på nivåene av næringsstoffer, antinæringsstoffer og metabolitter

Faggruppen vektlegger at hoveddelen av maisforbruket i Norge er som dyrefôr og at mais til humant konsum utgjør mindre enn 1 % av energiinntaket både for voksne og barn under ett år. Daglig inntak av sukkermais vil bidra med 0,5 % av daglig anbefaling for vitamin C ved inntak lik medianen (data fra Den Norske mor barn studien). Ved maisinntak på 17,5 g/dag (97,5 % persentilen) vil ca 2,6 % av daglig anbefaling for vitamin C dekkes. Når det gjelder dyrefôr ansees det naturlige vitamininnholdet i mais å være uten betydning da all mais som benyttes som fôr vitaminberikes i henhold til Mattilsynets anbefalinger. Tilsvarende angis krav til ernæringsmessig sammensetning av kornbasert barnemat i vedlegg 1 i Forskrift om bearbeidet kornbasert barnemat og annen barnemat til spedbarn og småbarn (FOR 2002-10-18 nr 1185). Faggruppen vurderer derfor at et eventuelt avvikende nivå av vitamin C i Bt11 x MIR162 x GA21 har liten ernæringsmessig betydning i Norge.

Med unntak av insektsresistens og herbicidtoleranse viser feltforsøk i USA en vekstsesong små eller ingen statistiske signifikante forskjeller mellom den transgene maishybriden Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21 og en umodifisert kontrollinje med hensyn på agronomiske og morfologiske

karakterer. Det er ikke foretatt analyser av maishybridene Bt11 x MIR162 x GA21 med hensyn på agronomiske karakterer.

4. Dokumentasjon av toksisitet og allergisitet

4.1. Toksisitet

Virkningsmekanisme vip-tokisner

Vip3A toksiner er giftige for larver i insektsordenen *Lepidoptera*. Dette gjelder arter i slektene *Agrotis*, *Heliiothis*, *Helicoverpa*, *Spodoptera* og *Striacosta* (Estruch *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1997; van Frankenhuyzen & Nystrom, 2002). Virkningsmekanismen til Vip3A-toksinene er svært lik Cry-toksinene, men den er ikke identisk med Cry-toksiner. *Vip3A* genet koder for et protein på ca. 88 kDa (Yu *et al.*, 1997). Full-lengde Vip3A-proteiner blir ved inntak av larven proteolytisk spaltet til et aktivt larvetoksin på ca. 62 kDa (Lee *et al.*, 2003, Yu *et al.*, 1997). Dette proteinet binder seg til reseptorer i tarmepitelet i mellomtarmen (Yu *et al.*, 1997). Reseptorbindings- og ligandbindingsstudier viser at Vip3A toksinet ikke binder seg spesifikt til Cry1Ab-, Cry1Ac- og Cry1Fa-reseptorer i tarmen til larver fra ordenene *Helicoverpa* og *Heliiothis* (Sena *et al.*, 2009; Lee *et al.* 2003). Kompetitive bindingsstudier viser at bindingssetene på de reseptorene som Vip3A-toksinet binder seg til er forskjellig fra bindingssetene på reseptorene som Cry-toksinene binder seg til (Sena *et al.*, 2009, Lee *et al.*, 2003). Voltage clamp assay på dissekert mellomtarm fra larver til tobakksvermer (*Manduca sexta*) viste at proteolytisk spaltet Vip3A-protein danner porer i epitelet, mens fullengde Vip3A-protein var inaktivt (Lee *et al.*, 2003). De generelle symptomene på forgiftning av sensitive larver ligner på de til Cry-toksinene, dvs. larvene slutter å spise, tap av tarmperistaltikk, generell paralyse av larven og død (Lee *et al.* 2003).

Akutt oral fôringsstudie på mus

Syngenta henviser til andre søknader der det er utført akutt oral fôringsstudier på mus med renfremstilt mEPSPS, PAT, PMI og Cry1Ab produsert av *E. coli*. Studiene er utført i henhold til GLP-retningslinjene fra EPA (40 CFR Part 160, 1989) og EU(-OECD Good Laboratory Practices (OECD 1998)). Fôringsstudiene er dokumentert i søknadene for foreldrelinjene Bt11 (EFSA-GMO-RX-Bt11, Part I, Section D.7.8.1), og GA21(EFSA-GMO-UK-2005-19, Part I, Section D.7.8.1).

Toksisitetsstudier utført av Syngenta knyttet til søknad EFSA/GMO/DE/2009/67:

Syngenta har utført akutt oral fôringsstudier på mus med renfremstilt PMI- og Vip3Aa20-protein produsert av *E. coli*.

PMI:

Forsøket med PMI er utført i henhold til god laboratoriepraksis (GLP) (Japans MAFF-retningslinjer, OECD, US EPA-FIFRA) og i henhold til EPAs retningslinjer for testing av pesticider (US EPA Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision F, Hazard Evaluation: Human and Domestic animals, Series 81-1, og OPPTS No. 870.1100). Testsubstansen (PMI-0198) inneholdt ca. 60 % PMI-protein. Tjue prosent (vekt/volum) PMI-protein ble løst i 0,5 % karboksymetylcellulose. To grupper á 7 hann- og 6 hunnmus i hver gruppe ble eksponert for henholdsvis 0 og 5050 mg PMI-0198 testsubstans/kg kroppsvekt, ekvivalent til 3030 mg rent PMI/kg kroppsvekt. Kontrollmus (0 mg PMI-0198/kg kroppsvekt) ble eksponert for 25,25 ml karboksymetylcellulose/kg kroppsvekt (negativ kontroll). Alle dyrene ble minst 3 ganger daglig observert for kliniske tegn på forgiftning over en periode på 15 dager. Ved avslutning av forsøket ble alle dyrene avlivet, og bukhole, toraks, samt en rekke organer og vev ble undersøkt makroskopisk. Lever, milt, hjerne og nyrer ble veid. Det ble ikke påvist økt mortalitet eller toksiske effekter på dyrene som ble eksponert for PMI og karboksymetylcellulose. Det ble konkludert med at en dose på 3030 mg PMI/kg kroppsvekt for mus ikke er akutt toksisk.

Vip3Aa20:

Forsøket med Vip3Aa20 er utført i henhold til god laboratoriepraksis (GLP) (UK Principles of Good Laboratory Practice: The UK GLP Regulations 1999, Statutory Instruments No. 3106 as amended

2004, Statutory Instruments No. 994, disse retningslinjene er i henhold til OECD GLP-retningslinjer). Fôringsforsøket er også utført i henhold til EUs retningslinjer for testing av tilsetningsstoffer til fôr, US-FDA Redbook 2000: Toxicological Principles for the Safety of Food Ingredients, US-EPA retningslinjer Microbial Pesticide Test Guidelines og Health Effects Test Guidelines.

Testsubstansen (MIR162VIPA-0106) inneholdt ca. 84 % (vekt/vekt) Vip3Aa20-protein. På grunn av lav vannløslighet ble testsubstansen løst i maisolje, 1488 mg/5 ml. To grupper á 5 hann- og 5 hunnmus i hver gruppe ble eksponert for henholdsvis 0 og 1488 mg testsubstans/kg kroppsvekt, ekvivalent til 1250 mg rent Vip3Aa20/kg kroppsvekt. Kontrollmus (0 mg testsubstans/kg kroppsvekt) ble eksponert for 5 ml maisolje/kg kroppsvekt (negativ kontroll). Alle dyrene ble daglig observert for kliniske tegn på forgiftning over en periode på 15 dager. De første dagene ble det påvist diaré hos enkelte av både test- og kontrolldyrene, noe som i henhold til Syngenta skyldes maisoljen. Fôrintak ble målt hver dag. Ved avslutning av forsøket ble alle dyrene avlivet, og bukhole, toraks, samt en rekke organer og vev ble undersøkt makroskopisk.

Følgende organer ble støpt i parafinvoks og snittet i 5 µm snitt, farget i hematoxylin og eosin. Det ble utført histologiske undersøkelser på følgende organvev fra alle dyrene: abnormal tissue, adrenal gland, aorta, bone marrow (femur), brain (cerebrum, cerebellum, brainstem), caecum, colon, duodenum, epididymis (males only), eyes (retina, optic nerve), gall bladder, heart, ileum, jejunum, kidney, larynx, liver, lung, lymph nodes (cervical & mesenteric), mammary gland (females only), nerve (sciatic), nose, oesophagus, ovary (females only), oviduct (females only), pancreas, parathyroid gland, Peyer's patches, pharynx, pituitary gland, preputial gland (males only), prostate gland (males only), rectum, salivary gland, seminal vesicle (males only), skin, spinal cord, spleen, sternum, stomach, testis (males only), thymus, thyroid gland, trachea, urinary bladder, uterus (with cervix) (females only), voluntary muscle.

Lever, milt, hjerne, hjerte, nyrer, testis og epididymes, ovarier og binyrer ble veid. Det ble undersøkt for blodkjemi og hematologi. Det ble ikke påvist økt mortalitet eller toksiske effekter på dyrene som ble eksponert for Vip3Aa20 og maisolje. Det ble konkludert med at en dose på 1250 mg Vip3Aa20/kg kroppsvekt for mus ikke er akutt toksisk.

Fôringsforsøk på rotter

Det er ikke utført fôringsforsøk med Bt11 x MIR162 x GA21. Dokumentasjonen fra søker inneholder kun 13 ukers fôringsforsøk på rotter med foreldrelinjen MIR162. I tillegg vises det til tidligere subkroniske fôringsforsøk med Bt11 og GA21. Dette er i tråd med EFSA's retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter med stabile egenskaper (EFSA 2007).

Fôringsforsøket med MIR162 inkluderte 6 ukers gamle hann- og hunnrotter (stamme Alp:APfSD), 4 grupper á 12 rotter/kjønn. Standard rottefôr tilsatt 10 % og 41,5 % maiskorn fra MIR162 og umodifisert næringsgenetisk kontrollsort ble gitt til de respektive gruppene med rotter. Drikkevannet til rotten ble periodevis undersøkt for kontaminanter. Fôrintak ble målt ukentlig, og kroppsvekt ble målt hver dag den første uken, siden ukentlig. Ved avslutning av forsøket ble alle dyrene avlivet, og bukhole, toraks, samt alle organene og flere vev ble undersøkt makroskopisk.

Det er utført mikroskopiske undersøkelser av alle organene. De ble støpt inn i parafinvoks, snittet i 5 µm snitt og farget i hematoxylin og eosin. Det ble utført histologiske undersøkelser på vev fra alle dyrene: abnormal tissue, adrenal gland, aorta, bone marrow (femur), brain (cerebrum, cerebellum, brainstem), caecum, colon, duodenum, epididymis (males only), eyes (retina, optic nerve), gall bladder, heart, ileum, jejunum, kidney, larynx, liver, lung, lymph nodes (cervical & mesenteric), mammary gland (females only), nerve (sciatic), nose, oesophagus, ovary (females only), oviduct (females only), pancreas, parathyroid gland, Peyer's patches, pharynx, pituitary gland, preputial gland (males only), prostate gland (males only), rectum, salivary gland, seminal vesicle (males only), skin, spinal cord, spleen, sternum, stomach, testis (males only), thymus, thyroid gland, trachea, urinary bladder, uterus (with cervix) (females only), voluntary muscle.

Det ble også foretatt klinisk patologisk undersøkelser av blod fra alle dyrene i hver gruppe. Det ble undersøkt for blodkjemi og hematologi. Søker konkluderer med at det ikke er påvist test-relaterte endringer i overlevelse, kliniske tegn, kroppsvekt, forinntak, klinisk patologi, organvekt, funksjonelle parametre som gripestyrke og motorisk aktivitet, samt makroskopisk og mikroskopisk patologi.

Føringsforsøket er blitt utført i henhold til GLPS (U.S. EPA FIFRA 40 CFR part 160), OECDs retningslinjer nummer 408 subkroniske tester på dyr (Guidelines for Testing of Chemicals, Health Effects Test Guidelines, Section 408), U.S. EPA, OPPTS 870.3100 90-Day Oral Toxicity in Rodents, Health Effects Test Guidelines (1998) og US-FDA Redbook 2000, Toxicological principles for the Safety Assessment of Food Ingredients (2003): IV.C.4.a. Subchronic Toxicity Studies with Rodents.

Føringsforsøk på broiler

Det er ikke utført føringsforsøk på broiler med Bt11 x MIR162 x GA21

Søknaden inneholder dokumentasjon fra 44 - og 49-dagers føringsforsøk på broilere med henholdsvis MIR162 og Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21. Det ble foretatt føringsstudier på hann- og hunnfugl, Ross x Ross. For hver av maisene ble det satt opp 6 grupper à 90 hann- og hunnfugler per gruppe. Broilerne ble føret i henholdsvis 44 og 49 dager. Studien ble utført i henhold til prinsippene for U.S. EPA FIFRA (40 CFR part 160) Good Laboratory Practice Standards. Dyrene ble føret med maismel fra henholdsvis MIR162 og Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21 samt ikke transgen, næringsgenetisk kontroll for hver av maisene. En kommersielt tilgjengelig umodifisert maissort ble benyttet i hvert av forsøkene (NC 2006 i MIR162-forsøket og NC 2007 Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21 forsøket). Føret ble undersøkt for en rekke ernæringsmessige komponenter, mykotoksiner, mineraler, samt konsentrasjon av Cry1Ab-, mCry3A-, mEPSPS-, total PMI (PMI og MIR 604 PMI)-, PAT- og Vip3Aa20-protein. Startføret (dag 0-21) inneholdt ca. 50 % mais, vekstfasefôr (dag 22-35) inneholdt ca. 56 % mais, og slutføringfaseføret (dag 36-42) inneholdt 61 % mais (likt for alle gruppene). Gjennomsnittlig eksponering av Vip3Aa20-protein for MIR162 var 15 µg/g fôr og for Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21 var mengdene for startfôr, vekstfôr og slutfôr henholdsvis 6,7-, 6,8- og 19,7 µg/g. Følgende parameter ble undersøkt: mortalitet, vektøkning, føreffektivitet, vekt av skrott, bryst, lår, vinger og abdominalt fett. Sammenlignet med kontroll- og referansesorten ble det ikke påvist statistisk signifikante endringer i de målte parametrene ved føring med mais fra MIR162 og Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21.

Andre toksisitetsstudier med MIR162, Vip3Aa1, Vip3Aa19 og Vip3Aa20.

Toksisitetsstudier som er referert i US EPA Biopesticides Registration Action Document (USA EPA 2009), viser at det er foretatt flere toksisitetsstudier enn de som er dokumentert i EFSA-søknaden EFSA/GMO/DE/2009/66 og EFSA/GMO/DE/2009/67. Syngenta har foretatt ytterligere tre akutt føringsstudier med Vip3Aa på hann- og hunnmus. To av studiene er utført med *E. coli*-produsert Vip3Aa, den tredje er utført med Vip3Aa19 rensset fra blad fra Syngentas mais Event Pacha. Det ble konkludert med at LD₅₀ er >3675 mg/kg kroppsvekt.

En 14-dagers toksisitetsstudier med vaktel (*Colinus virginianus*) og 30-dagers studie med malle (*Ictalurus punctatus*) viser ingen toksiske effekter av henholdsvis Vip3Aa1 og Vip3Aa19 ved doser på 400 mg/kg kroppsvekt for vaktel og 7,1 µg/g i fiskefôr.

Toksisitetsstudiene med PMI er godt dokumentert i tidligere søknader, og er derfor ikke inkludert i vurderingen.

I tillegg ble det i 2005 publisert et føringsforsøk med broilere. Broilerfødrene inneholder henholdsvis event Pacha, som inneholder Vip3Aa19-protein, og to umodifiserte kontrollersorter. Det ble konkludert med at føret ikke hadde skadelige effekter på broilerne (Brake *et al*, 2005).

4.2. Allergenitet

Undersøkelser av allergent potensiale av er utført i henhold til anbefalinger fra Codex (2003) og FAO/WHO (2000, 2001). Sammenligning av et proteins aminosyresekvens med aminosyresekvensen til et kjent allergent protein er en nyttig indikator på allergent potensiale. Aminosyresekvensen til de fleste viktige allergener, deriblant matallergener, er kjent. De viktige IgE-bindingsepitopene, dvs. aminosyresekvenser på 8-12 aminosyrer (noen ganger færre) der IgE binder seg, er kartlagt for mange allergener. Eksakt konservering av epitopesekvenser er påvist mellom homologe allergener i forskjellige arter. For proteinene Vip3Aa20, PMI, Cry1Ab, PAT og mEPSPS ble det ikke funnet noen signifikant sekvenshomologi på 8 eller større aminosyresekvenser til allergene proteiner.

Allergene proteiner i mat er ofte varme- og syrestabile. Matallergenene er oftest, men ikke alltid, stabile overfor mage- og tarmsafter. Allergene matproteiner er ofte de proteinene som forekommer i størst mengde i matvarer. Typiske mengder er fra 1-80 % av proteininnholdet. Konsentrasjonen av proteinene Vip3Aa20, PMI, Cry1Ab, PAT og mEPSPS i korn er ca 0,01 % av total proteinmengde, og utgjør således en svært liten del av det totale proteininnholdet. Vip3Aa20-, PMI-, Cry1Ab-, PAT- og mEPSPS-proteinene er testet i simulert mage- og tarmsaft. Med unntak av Vip3Aa20, brytes proteinene ned i løpet av ca. 30 sekunder. Det antas derfor at proteinet også brytes raskt ned i menneskets mage- og tarmkanal.

Basert på de testene som er omtalt, dvs. at Vip3Aa20-, PMI-, Cry-, PAT- og mEPSPS -proteinene ikke har noen aminosyresekvenser som har likhet med allergene proteiners epitoper, at proteinet brytes raskt ned av mage-tarmsafter og at andel av totalt proteininnhold er ca 0,01 % anser faggruppen det som lite trolig at proteinene Vip3Aa20, PMI, Cry1Ab, PAT og mEPSPS har større potensiale for å gi utvikling av matallergi hos mennesker enn det som umodifisert mais har.

Faggruppen konkluderer med at proteinene Vip3Aa20, PMI, Cry1Ab, PAT og mEPSPS sannsynligvis ikke er mer allergene eller toksiske enn de respektive villtypeproteinene.

Bt-proteiner

Flesteparten av *Bt*-plantevernmidler inneholder krystalltoksiner (protoksin) og levende sporer fra *Bt*-bakterien (EHC 1999). Laboratoriestudier med pattedyr indikerer ingen potensielle allergiske reaksjoner mot *Bacillus thuringiensis* eller dets komponenter, innbefattet delta (δ)-endotoksinet i krystallprotein (EHC 1999). Etter vel 50 års bruk av plantevernmidler med *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* er det med ett unntak, ingen bekreftede rapporter over øyeblikkelige eller forsinkede allergiske reaksjoner. Dette til tross for betydelig human oral-, dermal- og inhalasjonseksposering (EHC 1999). Helseundersøkelse av en liten gruppe gårdsarbeidere (48 arbeidere) som brukte *Bt*-plantevernmidler viste ved hudtesting statistisk signifikant reaksjon mot *Bt*-sporeekstrakter i forhold til lav- og medium *Bt*-eksponeringsgrupper (Bernstein *et al.* 1999). Lav- og medium-eksponeringsgruppene var ikke i direkte kontakt med *Bt*-plantevernmidler. Positiv hudtest mot *Bt* pro- δ -endotoksiner ble også påvist hos to arbeidere i gruppen som brukte *Bt*-plantevernmidler (Bernstein *et al.* 1999).

Adjuvans (fremming av immunreaksjon mot andre stoffer)

Det har ikke vært utført immunologiske studier med de transgene produktene. Det er vist at Cry1Ac-proteinet binder seg til musetarmoverflaten (Vazquez-Padron *et al.* 2000a) og induserer immunologiske reaksjoner mot seg selv og mot proteiner gitt samtidig (Vazquez *et al.* 1999). Immunologisk kartlegging av systemisk og mucosal immunreaksjon på Cry1Ac har videre påvist at mus lager både systemisk IgM, IgG og sekretorisk IgA etter intraperitoneal og intragastrisk immunisering (Vazquez-Padron *et al.* 2000b). Det er ukjent om Cry1Ac-proteinet som er benyttet i disse studiene, tilsvarer 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 ved intranasal og intraperitoneal immunisering i to senere publikasjoner med henholdsvis pneumokokk-antigen (Moreno-Fierros *et al.* 2003) og amøbe-lysate (Rojas-Hernández *et al.* 2004). Adjuvanseffekten av Cry1Ac ble funnet å være like sterk som adjuvanseffekten av koleratoksin (Vazques-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.

I en senere studie av Guimaraes *et al.* (2008) undersøkte man adjuvans-effekter av Cry1Ab i forbindelse med allergisk sensibilisering overfor peanøttekstrakt (PE). Koleratoksin (CT) som er en kjent Th2 adjuvant, ble benyttet for sammenligning. I disse forsøkene ble det ikke induert spesifikk IgE ved bruk av Cry1Ab som adjuvant, mens induksjon av spesifikk IgE ble påvist ved bruk av CT som adjuvant. Imidlertid viste den samme undersøkelsen at når PE ble gitt sammen med Cry1Ab så medførte dette at når musene på et senere tidspunkt ble provosert med PE så økte produksjon av leukotriener (CTC4 og CTE4) i bronkiene umiddelbart. I tillegg ble det 36 timer etter provokasjonen målt økt produksjon av Th2- og Th17 cytokiner og økt influks av neutrofiler og eosinofiler. Det ble dermed konkludert med at Cry1Ab har en adjuvanseffekt i forhold til allergi.

Det gjennomsnittlige inntaket av maismel, sukkermais og popkorn i Europa er beregnet av Dow AgroSciences og er dokumentert i søknaden MON 89034 x 1507 x MON 88017 x 59122 (EFSA/GMO/CZ/2008/32). Mengdene av de enkelte matvarene er vist i tabell 8. Det daglige inntaket av disse matvarene i Europa er beregnet som g/person/dag, mens 97,5 persentilen for høyt inntak på verdensbasis er beregnet som g/kg kroppsvekt/dag.

Tabell 9. Estimerer over maisinntak fra GEMS/Food Programme.

	DAGLIG INNTAK (g/person/dag)			HØYT INNTAK (g/kg kroppsvekt/dag)	
	Gjennomsnittlig inntak per capita i EU			Høyest 97,5 persentil	
Cluster-diett (region)	Cluster B (Sør-Europa)	Cluster E (Sentral-Europa)	Cluster F (Nord-Europa)	Generell befolkning	Barn ≤ 6 år
Maismel	15,4	14,7	2,0	2,04	3,16
Sukkermais	2,0	6,5	7,2	7,16	11,52
Popkorn	0,2	0,1	0,1	3,33	3,33
Totalt	17,6	21,3	9,3	NA	NA

Kilde: Dow AgroSciences, søknad EFSA/GMO/CZ/2008/62.

Spesielle målgrupper, som barn, har et større inntak av mais enn det beregnede gjennomsnittlige inntaket på verdensbasis (se tabell 9). I henhold til tabellen er det estimerte inntaket for store porsjoner, 97,5 persentil, for barn under 6 år for henholdsvis maismel, sukkermais og popkorn 3,16, 11,52 og 3,33 g/kg kroppsvekt/dag, og for den generell befolkningen er inntaket henholdsvis 2,04, 7,16 og 3,33 g/kg kroppsvekt/dag. De estimerte inntaksmengdene for 97,5 persentilen kommer fra ulike geografiske områder, som Frankrike, Australia, Thailand og Japan. I henhold til Syngenta kan maksimum mengde Cry1Ab i maiskorn være ca. 7,8 µg/g tørrvekt korn. Dersom høyeste inntaksmengde (97,5 persentilen) av mais kommer fra Bt11 x MIR162 x GA21, vil inntaket av maismel, sukkermais og popkorn for henholdsvis barn og voksne utgjøre ca. 25, 88 og 26 µg Cry-protein/kg kroppsvekt/dag, og 16, 56 og 26 µg/kg kroppsvekt/dag. De totale mengdene Cry-proteiner fra henholdsvis maismel, sukkermais og popkorn blir for barn med kroppsvekt 21 kg 525, 1850 og 550 µg/barn/dag, og for voksne med kroppsvekt 60 kg 960, 3360 og 1560 µg/person/dag. For de estimerte inntaksmengdene av Cry-protein som er presentert her er det ikke tatt hensyn til eventuelle

nedbrytning av proteinene ved prosessering. De estimerte inntaksmengdene av Cry-proteiner antas å representere maksimal eksponering. De mengder Cry1Ac som ga mucosal adjuvanseffekt ved sondeføring av mus var fra 0,1 µg til 100 µg per mus (Vazquez *et al.* 1999).

De adjuvansdoser som brukes for immunisering av mus og mennesker i andre sammenhenger er ofte av samme størrelsesorden, det vil si om lag samme dose (ca. 10 µg) brukes til mus og menneske. Det er mulig at Cry1Ab-toksinet som benyttes i Bt11 x MIR162 x GA21 kan ha tilsvarende effekter som vist for det beslektede Cry1Ac-proteinet, som induserer immunologiske reaksjoner mot seg selv og økt reaksjon mot proteiner gitt samtidig. Dersom 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.

Et realistisk inntak av Cry-protein vil imidlertid være vesentlig lavere enn de mengdene som er angitt ovenfor. Mais er en bulkvare hvor flere typer mais fra mange åkre samles i felles siloer før videre prosessering. Man vil således aldri spise 100 % Bt11 x MIR162 x GA21 -mais. Med unntak for sukkermais spiser vi stort sett prosessert mais hvor, i mange tilfeller, proteinene er helt eller delvis degradert eller fjernet. Søker oppgir at Cry1Ab-proteinet brytes raskt ned i magesaft. Eksponering av tarmepitel for Cry1Ab-proteinet forventes dermed å være vesentlig lavere.

Cry-proteinene er ikke varmemestabile. Konsentrasjonen av Cry1Ab ble redusert med 90 % i maisgrøt som ble holdt ved 75 °C i 3 min. Proteinet kunne ikke påvises etter steking av tortillas ved 190 °C i 10 s (de Luis *et al.* 2009). Dette innebærer igjen at eksponering av tarmepitel for Cry-proteiner vil være vesentlig lavere.

Adjuvanseffekt og induksjon av IgE er ikke undersøkt for Cry1Ab. Det finnes lite litteratur på området omkring betydning av adjuvanter for induksjon av IgE-mediert allergisk respons. Den foreliggende litteratur tyder i flere tilfeller på at betydningen er liten. I en musemodell for allergiutvikling mot lupin ga bruk av koleratoksin (CT) økt immunrespons for andre immunoglobulin klasser, men ingen IgE respons. Forfatterne antyder at IgE respons er mer avhengig av indre egenskaper ved allergenene og ikke CT-adjuvans (Foss *et al.* 2006). I en lignende rottemodell viste CT også kun en begrenset effekt på utvikling av peanøttallergi (de Jonge *et al.* 2007). De Jonge *et al.* Viste også at det var krevende å klare å indusere allergi i rottene. Rotter som gikk på streng diett i 3 generasjoner ga IgE respons, mens rotter som gikk på allergenfri diett i én generasjon ga ikke IgE respons etter indusering. Disse forsøkene indikerer en begrenset betydning av adjuvans for utvikling av IgE mediert allergi. Utvikling av matallergi skyldes et komplekst samspill av faktorer bla genetisk predisposisjon, alder ved introduksjon av allergenet, amming, sammensetning av ernæring, sammensetning av tarmfloraen og infeksjonsstatus i mage-tarm systemet (van Wijk & Knippels 2007).

Maten vi spiser inneholder en lang rekke stoffer som virker som adjuvanter (Berin & Schreffler 2008). Eksempler på disse stoffene er glukaner og lectiner som er vanlige i alt plantemateriale, proteinaser og chitin, en hovedbestanddel i cellevegg hos sopp. Det kan derfor reises tvil om tilstedeværelsen av små mengder av et adjuvant protein vil bidra til noen økt risiko for induksjon av IgE dannelse. Det anføres i tillegg at Cry-proteinene har en 50 år lang historie med trygg bruk. Det er tillatt å sprøyte mais med *Bt* helt frem til høsting, men nivået av Cry-protein vil være langt lavere i *Bt*-sprøytet mais enn i genmodifisert mais. Maislinjen MON 810, som inneholder Cry1Ab-proteinet, har vært dyrket og konsumert siden 1996.

4.3. Delkonklusjon

mEPSPS- og PAT- proteinene, som uttrykkes som følge av genmodifiseringen, har ingen likheter med kjente toksiner og allergener, eller egenskaper som tilsier at det vil virke som et allergen eller toksin. Innholdet av disse proteinene i korn er ca 0,01 % av totalt protein, og utgjør således en svært liten del

av det totale proteininnholdet. Faggruppen finner det lite sannsynlig at eksponering av mEPSPS og PAT-proteinene i seg selv og i de mengder som tilføres via genmodifisert mais er helsemessig betenkelig. Akutte fôringsstudier (oral sondefôring) på mus med bakterieframstilt mEPSPS-, PAT-, PMI-, Cry1Ab- og Vip3Aa20-protein viser ingen skadelige helseeffekter. Videre konkluderer ernæringsstudier med broilere at maishybriden Bt11 x MIR162 x GA21 er ernæringsmessig lik umodifisert mais.

Faggruppen påpeker at subkronisk fôringsforsøk på rotte med Bt11 x MIR162 x GA21 ikke er utført.

Ingen av proteinene Cry1Ab og Vip3Aa20 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, d.v.s. fremming av immunreaksjon mot andre stoffer.

Et flertall av medlemmene i Faggruppe for genmodifiserte organismer finner det ikke sannsynliggjort at Cry1Ab har egenskaper som fører til hemming av den toleransen som fordøyelsessystemets slimhinner har mot proteiner (adjuvanseffekt). På bakgrunn av at Cry1Ab-proteinet brytes ned i magesaft og at maten for øvrig inneholder en lang rekke stoffer som virker som adjuvanter, vurderes adjuvansproblemstillingen i forbindelse med Bt11 x MIR162 x GA21 til å være neglisjerbar.

Et mindretall av faggruppen (A.H. Nerland, T. Bøhn, A.I. Myhr, C. Linnestad, H. Klungland, K.M. Nielsen) finner det vanskelig å vurdere om næringsmidler og fôrvarer fra maishybriden Bt11 x MIR162 x GA21 er mer allergifremkallende enn næringsmidler og fôrvarer fra umodifiserte maiskorn. På bakgrunn av foreliggende eksperimentelle studier i mus, som viser at Cry-proteiner kan hemme den toleransen som fordøyelsessystemets slimhinner har mot proteiner, finner imidlertid medlemmene at muligheten for økt allergifremkallende aktivitet hos Bt11 x MIR162 x GA21 ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes.

En samlet faggruppe finner at mat- og fôrprodukter Bt11 x MIR162 x GA21 som ikke inneholder Cry-proteiner, eksempelvis oljebaserte produkter, ikke medfører endret risiko for helse i forhold til annen mais.

5. Miljørisikovurdering

Syngenta Crop Protections søknad om godkjenning av maishybriden Bt11 x MIR162 x GA21 under EU forordning 1829/2003/EF omfatter bruksområdene fôrvarer, næringsmidler, import og prosessering. Søknaden gjelder ikke dyrking. Miljørisikovurderingen av de transgene maislinjene er derfor avgrenset til mulige effekter av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport og prosessering til mat, fôr og ulike 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 utilsiktede effekter på fitness relatert til genmodifiseringen

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

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

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

Herbicidtoleranse kan bare betraktes å være en selektiv fordel for den transgene planten på arealer der det benyttes herbicider med virkestoff glyfosat eller glufosinat ammonium. Tilsvarende vil resistens mot visse skadegjørere i ordenen *Lepidoptera* representere en potensiell fordel der målorganismene er til stede under dyrking. Overlevelse og spredning av mais til andre habitater i Europa er imidlertid hovedsakelig begrenset av dårlig konkurransevne, manglende frøkvile, mottagelighet for sjukdom og liten toleranse for lave temperaturer. Undersøkelsene av fenotypiske karakterer som er foretatt av søker viser ingen forskjeller mellom den insektresistente maislinjen og konvensjonelle sorter med tilsvarende genetisk bakgrunn for disse karakterene. Det er ingen indikasjoner på at de introduserte egenskapene hos Bt11 x MIR162 x GA21 vil medføre økt fitness, og økt evne til overvintring eller etablering av ugraspopulasjoner 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. Mais har ikke viltvoksende populasjoner eller nærstående arter utenfor dyrking i Europa, og vertikal genoverføring vil 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, 2009; VKM 2005).

Ut fra dagens vitenskapelige innsikt med hensyn til barrierer for genoverføring mellom ubeslektede arter og flere års forskning for om mulig å framprovosere tilfeldig overføring av genetisk materiale fra planter til mikroorganismer er det lite som tyder på at transgenene i Bt11 x MIR162 x GA21 skal kunne overføres til andre enn naturens kryssingspartnere ved detekterbare frekvenser i laboratoriestudier. Det er gjort forsøk som ser på stabilitet og opptak av DNA fra tarmkanalen hvor mus er oralt tilført M13 DNA. Det tilførte DNAet var sporbart i avføring opp til syv timer etter fôring. Svært små mengder av M13 DNA (<0.1 %) kunne spores i blodbanene i en periode på maksimum 24 timer, mens M13 DNA ble funnet i opptil 24 timer i lever og milt (Schubbert *et al.* 1994). Ved oralt inntak av genmodifisert soya er det vist at DNA er mer stabilt i tarmen hos personer med utlagt tarm sammenlignet med kontrollgruppen (Netherwood *et al.* 2004). I kontrollgruppen ble det ikke påvist GM DNA i feces. Nielsen *et al.* (2000) og De Vries & Wackernagel (2002) har undersøkt persistens av DNA og opptak av GM DNA i jord. I disse laboratorieforsøkene ble det påvist svært små mengder DNA som var overført fra planter til bakterier.

Disse mengdene må imidlertid multipliseres med skalaen for dyrking, som er svært omfattende. I studiene til De Vries & Wackernagel var forutsetningen for overføring sekvenshomologi mellom

plantetransgenet og mottagerbakterien. De innsatte genene i planten har sin opprinnelse fra jordbakterier og sekvenshomologi vil derfor være stor i forhold til disse. I hvilken grad det forekommer tilfeldig sekvenshomologi mellom plantetransgener og andre naturlig forekommende bakterier er usikkert, men siden de fleste transgenene inneholder rekombinerte DNA sekvenser fra jordbakterier kan dette ikke utelukkes (Bensasson *et al.* 2004)

Med bakgrunn i opprinnelse og karakter/egenskaper av de innsatte genene og mangel på seleksjonspress i fordøyelseskanal og/eller miljøet, er sannsynligheten for at horisontal genoverføring vil gi selektive fordeler eller økt fitness på mikroorganismer svært liten (Nielsen 2003). Det er derfor usannsynlig at gener fra Bt11 x MIR162 x GA21 vil etableres stabilt i genomet til mikroorganismer i miljøet eller i fordøyelseskanalen hos mennesker eller dyr. Ut fra tilgjengelig kunnskap og begrensninger i metodikk (Nielsen & Townsend 2004) kan det ikke utelukkes at horisontal genoverføring vil skje

5.2.2 Vertikal genoverføring

Potensialet for krysspollinering mellom maishybrid Bt11 x MIR162 x GA21 og konvensjonelt foredlete maissorter vil avhenge av omfanget av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport, håndtering og prosessering. Det er imidlertid lite sannsynlig at sporadiske enkeltplanter vil spre signifikante mengder pollen til konvensjonelle dyrkingsfelt. Dyrkingsomfanget av mais i Norge er dessuten svært begrenset. Risiko for utkryssing med dyrkede sorter vurderes derfor til å være ubetydelig.

Herbicidtoleranse og insektsresistens kan bare betraktes å være en selektiv fordel på arealer der det benyttes herbicider med de aktuelle virkestoffene og/eller der målorganismene er til stede under dyrking. Disse egenskapene vil imidlertid ikke representere økt sannsynlighet 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 i Norge.

Tatt i betraktning tiltenkt bruksområde for maishybriden, vil miljøeksponeringen være begrenset til sporadiske enkeltplanter fra frøspill i forbindelse med transport og prosessering.

5.3. Potensiale for samspill mellom GMP og målorganismer

Maishybriden Bt11 x MIR162 x GA21 inneholder de bakterielle genene *cry1Ab* og *Vip3Aa20*. *Cry1Ab*-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*. Det er rapportert om enkeltfunn av maispyralide i Vestfold, Telemark og Agder (<http://nhm.uio.no/norlep/>), men arten er ikke rapportert som skadegjører (Meadow 2007). Det er ikke gjort observasjoner av *Sesamia*-arter i Norge. *Vip3Aa20*-genet uttrykker et toksin som gir maisplantene resistens mot *Lepidoptera*-arter som *Spodoptera frugiperda* ('fall armyworm'), *Helicoverpa zea* ('corn earworm'), *Agrostis ipsilon* (stort jordfly) og *Striacosta albicosta* ('western bean cutworm'). Med unntak av stort jordfly, er disse artene ikke påvist i Europa (OK?) (<http://www.faunaeur.org/distribution.php>). Stort jordfly opptrer av og til som skadegjører i rotvekster i Norge, og er en mulig skadegjører i mais (Meadow 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 i Norge.

5.4. Potensiale for samspill mellom GMP og ikke-målorganismer

Sporadiske spillplanter av maishybriden Bt11 x MIR162 x GA21 med opphav i utsiktet 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-, VIP-, PAT-, EPSPS- og PMI-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 av de uttrykte proteinene blir spredt med husdyrgjødsel på dyrket mark, som igjen minimerer faren for eksponering av potensielt sensitive ikke-målorganismer. Spredning av Cry-, VIP, PAT- og EPSPS-proteiner via gjødsel antas derfor ikke å gi signifikante miljøeffekter.

5.5. 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.

Søknad EFSA/GMO/DE/2009/67 omfatter ikke dyrking, og potensiell miljøeksponering av den transgene maishybriden er derfor avgrenset til mulige effekter av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport og prosessering til mat, fôr og industrielle formål. I tillegg vil indirekte eksponering gjennom gjødsel fra husdyr føret med genmodifisert mais representere en mulig kilde til uønsket genspredning. Miljørisikovurderingen som er presentert av søker identifiserer ingen endret risiko for miljø i forhold til annen mais. Syngenta har derfor ikke utarbeidet spesifikke strategier for risikohåndtering eller en særskilt plan for overvåking av maishybriden.

Tatt i betraktning tiltenkt bruksområde for Bt11 x MIR162 x GA21 anser Faggruppe for GMO at det ikke er behov for å iverksette særskilt program for overvåking av maishybriden.

5.4. Delkonklusjon

Søknaden gjelder godkjenning av maishybriden Bt11 x MIR162 x GA21 for import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av maishybriden. Med bakgrunn i tiltenkt bruksområde er miljørisikovurderingen avgrenset til mulige effekter av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport og prosessering, samt indirekte eksponering gjennom gjødsel fra husdyr føret med genmodifisert mais.

Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av maishybriden i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Norge er i utkanten av dyrkingsområdet for mais, dyrkingsomfanget er svært begrenset og det er ingen stedegne eller introduserte viltvoksende arter som mais kan hybridisere med.

6. Vurdering av søkers dokumentasjon

Faggruppen finner at søkers informasjon i stor grad følger OECDs retningslinjer, og er tilstrekkelig til at det er mulig å foreta en vurdering av den foreliggende GMO. Faggruppen påpeker imidlertid at det mangler analyser av vitamin C, en av komponentene som OECDs konsensusdokument for mais anbefaler analysert.

Søker har definert mye av dokumentasjonen knyttet til søknad EFSA/GMO/DE/2009/67 som konfidensiell informasjon. Det er ulik praksis mellom de ulike selskapene hvilke opplysninger som unndras offentlighet, og faggruppen etterlyser kriterier for hva søker kan definere som konfidensiell informasjon.

FG3s innspill til EFSA-nett 22. oktober 2009

D, 03

For stacked events, The Norwegian Scientific Committee for Food Safety would like to remind the applicant that EFSA requests a risk assessment on the potential for any interactions between the stacked events which could impact on human or animal health and/or the environment.

D, 07.02

According to the EFSA Guidance Document for the risk assessment of GM plants, it is advisable that experiments with herbicide tolerant crops “include both blocks of genetically modified plants exposed to the intended herbicide and blocks not exposed to the herbicide”. In the study report on the compositional analyses it is not indicated whether the experimental design also included Bt11 x MIR162 x GA21 maize blocks not treated with herbicides containing glyphosate and glufosinate-ammonium. The applicant is asked to clarify whether the field trials for comparative assessment include blocks of Bt11 x MIR162 x GA21 not exposed to the intended herbicide(s), and to include compositional data from Bt11 x MIR162 x GA21 maize treated and not treated with the herbicide(s).

D, 07.09 Allergenicity

7.9.2 Assessment of allergenicity of the whole GM plant or crop

Scientific studies, also very recent ones, have shown that the Cry1Ac protein is a potent systemic and mucosal adjuvant, which is an enhancer of immune responses. The GMO Panel of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety find it difficult, based on the available data, to assess whether kernels from maize Bt11 x MIR162 x GA21 may cause more allergenic reactions than food and feed from unmodified kernels. As the different Cry proteins are closely related, and in view of the experimental studies in mice, the GMO Panel finds that the likelihood of an increase in allergenic activity due to Cry1Ab proteins in food and feed from maize Bt11 x MIR162 x GA21 cannot be excluded. Thus, the Panel's view is that as the adjuvant effect of Cry1Ab with reasonable certainty cannot be excluded, the applicant in relation to a possible adjuvant effect of Cry1Ab must comment upon the mouse studies showing humoral antibody response of Cry1A proteins. Further, although Cry1Ab proteins is rapidly degraded in gastric fluid after oral uptake, there is also the possibility that the protein can enter the respiratory tract after exposure to e.g. mill dust. Finally, rapid degradation is no absolute guarantee against allergenicity or adjuvanticity.

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.

Prasad S.S.S.V. & Shethna, Y.I., 1975. Enhancement of immune response by the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 62: 517-521.

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

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

Vazquez RI. Moreno-Fierros L. Neri-Bazan L. De La Riva GA. Lopez-Revilla R., 1999. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand J Immunol.*, 49: 578-84.

Vazquez-Padron RI. Gonzales-Cabrera J. Garcia-Tovar C. Neri-Bazan L. Lopez-Revilla R. Hernandez M. Moreno-Fierro L. de la Riva GA., 2000a. Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. *kurstaki* HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. *Biochem Biophys Res Commun.*, 271:54-8.

KONKLUSJON

Komparative analyser

Analyser av ernæringsmessige komponenter er i hovedsak utført i tråd med OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002). Det er påvist signifikante forskjeller mellom maishybrid Bt11 x MIR162 x GA21 og kontroll i enkeltparametere. Verdiene for de analyserte komponentene ligger imidlertid innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen, samt innenfor toleranseintervallene for de umodifiserte referansesortene som er inkludert i søkers dokumentasjon.

Faggruppen påpeker at søker ikke har foretatt analyser av vitamin C. Det understrekes at konsensusdokumentet i størst mulig grad skal følges når det legges fram dokumentasjon på nivåene av næringsstoffer, antinæringsstoffer og metabolitter.

Faggruppen vektlegger at hoveddelen av maisforbruket i Norge er som dyrefôr og at mais til humant konsum utgjør mindre enn 1 % av energiinntaket både for voksne og barn under ett år. Daglig inntak av sukkermais vil bidra med 0,5 % av daglig anbefaling for vitamin C ved inntak lik medianen (data fra Den Norske mor barn studien). Ved maisinntak på 17,5 g/dag (97,5 % persentilen) vil ca 2,6 % av daglig anbefaling for vitamin C dekkes.

Når det gjelder dyrefôr ansees det naturlige vitamininnholdet i mais å være uten betydning da all mais som benyttes som fôr vitaminberikes i henhold til Mattilsynets anbefalinger. Tilsvarende angis krav til ernæringsmessig sammensetning av kornbasert barnemat i vedlegg 1 i Forskrift om bearbeidet kornbasert barnemat og annen barnemat til spedbarn og småbarn (FOR 2002-10-18 nr 1185). Faggruppen vurderer derfor at et eventuelt avvikende vitamin C nivå i Bt11 x MIR162 x GA21 har liten ernæringsmessig betydning i Norge.

Toksisitet og allergenitet

mEPSPS- og PAT- proteinene, som uttrykkes som følge av genmodifiseringen, har ingen likheter med kjente toksiner og allergener, eller egenskaper som tilsier at det vil virke som et allergen eller toksin. Innholdet av disse proteinene i korn er ca 0,01 % av totalt protein, og utgjør således en svært liten del av det totale proteininnholdet. Faggruppen finner det lite sannsynlig at eksponering av mEPSPS og PAT-proteinene i seg selv og i de mengder som tilføres via genmodifisert mais er helsemessig betenkelig. Akutte fôringsstudier (oral sondefôring) på mus med bakterieframstilt mEPSPS-, PAT-, PMI-, Cry1Ab- og Vip3Aa20-protein viser ingen skadelige helseeffekter. Videre konkluderer ernæringsstudier med broilere at maishybriden Bt11 x MIR162 x GA21 er ernæringsmessig lik umodifisert mais.

Faggruppen påpeker at subkronisk fôringsforsøk på rotte med Bt11 x MIR162 x GA21 ikke er utført.

Ingen av proteinene Cry1Ab og Vip3Aa20 har likheter med kjente allergener eller egenskaper som tilsier at de er allergener. Det er imidlertid ikke vurdert om Cry1Ab toksinet kan ha adjuvanseffekter. d.v.s. fremming av immunreaksjon mot andre stoffer.

Et flertall av medlemmene i Faggruppe for genmodifiserte organismer (8 medlemmer) finner det ikke sannsynliggjort at Cry1Ab har egenskaper som fører til hemming av den toleransen som fordøyelsessystemets slimhinner har mot proteiner (adjuvanseffekt). På bakgrunn av at Cry1Ab-proteinene brytes ned i magesaft og at maten for øvrig inneholder en lang rekke stoffer som virker som adjuvanter, vurderes adjuvansproblemstillingen i forbindelse med Bt11 x MIR162 x GA21 til å være neglisjerbar.

Et mindretall av faggruppen (T. Bøhn, H. Klungland, C. Linnestad, A.I. Myhr, A.H. Nerland, K. Nielsen) finner det vanskelig å vurdere om næringsmidler og fôrvarer fra maishybriden Bt11 x

MIR162 x GA21 er mer allergifremkallende enn næringsmidler og fôrvarer fra umodifiserte maiskorn. På bakgrunn av foreliggende eksperimentelle studier i mus, som viser at Cry-proteiner kan hemme den toleransen som fordøyelsessystemets slimhinner har mot proteiner, finner imidlertid medlemmene at muligheten for økt allergifremkallende aktivitet hos Bt11 x MIR162 x GA21 med rimelig sikkerhet kan utelukkes.

En samlet faggruppe finner at mat- og fôrprodukter Bt11 x MIR162 x GA21 som ikke inneholder Cry-proteiner, eksempelvis oljebaserte produkter, ikke medfører endret risiko for helse i forhold til annen mais.

Faggruppen har ikke vurdert problematikken knyttet til eventuelle rester av glufosinat og glyfosat, eller nedbrytingsprodukter fra disse i mat- og fôrprodukter av Bt11 x MIR162 x GA21. Slike vurderinger utføres av VKMs Faggruppe for plantevernmidler. Faggruppe for GMO legger imidlertid til grunn at produkter, der verdiene ligger under grenseverdiene for akseptabelt daglig inntak, ikke innebærer endret helserisiko i forhold til annen mais.

Miljørisiko

Med unntak av insektsresistens og herbicidtoleranse viser feltforsøk i USA over en vekstsesong små eller ingen statistiske signifikante forskjeller mellom den transgene maishybriden Bt11 x MIR162 x GA21 og en umodifisert kontrollinje med hensyn på agronomiske og morfologiske karakterer. Det er ikke foretatt analyser av maishybriden Bt11 x MIR162 x GA21 med hensyn på agronomiske karakterer.

Søknaden gjelder godkjenning av maishybriden Bt11 x MIR162 x GA21 for import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av maishybriden. Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av maishybriden i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Norge er i utkanten av dyrkingsområdet for mais, dyrkingsomfanget er svært begrenset og det er ingen stedege eller introduserte viltvoksende arter som mais kan hybridisere med.

Samlet vurdering

Flertallet av medlemmene i Faggruppe for genmodifiserte organismer (8 medlemmer) finner det lite trolig at bruk av maishybriden Bt11 x MIR162 x GA21 vil medføre endret risiko for helse og miljø i forhold til annen mais.

Et mindretall av faggruppen (A.H. Nerland, T. Bøhn, A.I. Myhr, C. Linnestad, H. Klungland, K.M. Nielsen) mener at dersom en ser bort fra adjuvansproblematikken, er det lite trolig at bruk av maishybriden Bt11 x MIR162 x GA21 vil medføre endret risiko for helse og miljø i forhold til annen mais. Mindretallet finner imidlertid at muligheten for økt allergifremkallende aktivitet hos Bt11 x MIR162 x GA21 ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes.

En samlet faggruppe påpeker kunnskapshull knyttet til adjuvans generelt og om Cry-proteinene i Bt11 x MIR162 x GA21 kan virke som adjuvant.

REFERANSER

- Agbios (2009). Agbios GM Database. Information on GM Approved Products.
<http://www.agbios.com/dbase.php>
- Albo, A. G., Mila, S., Digilio, G., Motto, M., Aime, S. & Corpillo, D. (2007). Proteomic analysis of a genetically modified maize flour carrying *cry1Ab* gene and comparison to the corresponding wild-type. *Maydica*, **52**: 443-455.
- Bensasson, D., Boore, J.L. & Nielsen, K.M. (2004). Genes without frontiers. *Heredity*, **92**, 483-489.
- Berin, M.C. & Schreffler, W.G. (2008). T_H2 adjuvants: Implications for food allergy. *J. Allerg. Clin. Immunol.*, **121**, 1311-1320.
- Bernstein, I.L., Bernstein, J.A., Miller, M., Tierzieva, S., David I. Bernstein, D.I., Zana Lummus, Z., Selgrade, M.J.K., Doerfler, D.L. & Seligy, V.L. (1999). Immune Responses in Farm Workers after Exposure to Bacillus Thuringiensis Pesticides. *Environ. Health Perspect.* **107**(7), 575-582.
- Brake, J., Faust, M. & Stein, J. (2005). Evaluation of Transgenic Hybrid Corn (VIP3A) in Broiler Chickens. *Poultry Science* **84**, 503-512.
- Codex (2003). Codex Alimentarius Commission, Alinorm 03/34: Joint FAO/WHO Food Standard Programme, Codex Alimentarius Commission, Twenty-Fifth Session, Rome, Italy, 30 June-5 July, 2003.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A. & Dean, D.H. (2009). "Bacillus thuringiensis toxin nomenclature"
http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. & Dean, D.H. (1998). Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**(3), 807-813.
- de Jonge, J. D., Knippels, L.M.J., Ezendam, J., Odink, J. Penninks, A. H. & van Loveren, H. (2007). The importance of dietary control in the development of a peanut allergy model in Brown Norway rats *Methods*, **41**, 99-111.
- de Luis, R., Lavilla, M., Sanchez, L., Calvo, M. & Perez, M. D. (2009). Immunochemical detection of Cry1A(b) protein in model processed foods made with transgenic maize. *European Food Research Technology* DOI 10.1007/s00217-009-1021-4.
- de Vries, J. & Wackernagel, W. (2002). Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **99**, 2094-2099.
- EFSA (2004). Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. *The EFSA Journal*, **48**, 1-18. http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_opinions/384.html

- EFSA (2006). *Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed*. 100 s. http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_guidance/660.html
- EFSA (2007). Guidance Document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants containing stacked transformation events. *The EFSA Journal*, **512**, 1-5. http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178623591786.htm
- EFSA (2009). Use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. Scientific Opinion of the Panel on Genetically Modified Organisms (GMO) and the Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *The EFSA Journal*, **1034**, 1-82. http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Statement/gmo_biohaz_st_ej1108_Consolidated_ARG_en.pdf?ssbinary=true
- EHC (1999). *Bacillus thuringiensis*. Environmental Health Criteria Monograph 217, International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, 1999.
- Estruch, J.J., Warren, G.W. Mullins, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A. & Koziestruch M.G. (1996) Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5389-5394.
- FAO/WHO (2000). Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- FAO/WHO (2001). *Evaluation of allergenicity of genetically modified foods*. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on foods derived from biotechnology. 22-25 January 2001. Rome: Food and Agriculture Organisation of the United Nations (<http://www.fao.org/es/esn/gm/allergygm.pdf>)
- Filipecki, M. & Malepszy, S. (2006). Unintended consequences of plant transformation: a molecular insight. *Journal of Applied Genetics*, **47**: 277-286.
- Foss, N., Duranti, M., Magni, C. & Frøkiær, H. (2006). Assessment of Lupin Allergenicity in the Cholera Toxin Model: Induction of IgE Response Depends on the Intrinsic Properties of the Conglutins and Matrix Effects. *Int Arch Allergy Immunol*, **141**, 141-150 (DOI: 10.1159/000094716).
- FSANZ (2008). APPLICATION A1001. Food derived from insect-protected corn line MIR162. Approval Report. Food Standards Australia New Zealand. http://www.foodstandards.gov.au/_srcfiles/A1001%20GM%20Corn%20AppR%20FINAL.pdf
- Guimaraes, V. D., Drumare, M. F., Ah-Leung, S., Lereclus, D., Bernard, H., Creminon, C., Wal, J. M. & Adel-Patient, K. (2008). Comparative study of the adjuvanticity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protein and cholera toxin on allergic sensitisation and elicitation to peanut. *Food and Agricultural Immunology*, **19**, DOI 10.1080/09540100802495651|PII 09540100906477739.
- Hallauer, A.R. (2000). Potential for outcrossing and weediness of genetically modified insect protected corn. APHIS-USDA.
- ILSI (2007). International Life sciences Institute Crop Composition Database Version 3.0. URL: <http://www.cropcomposition.org>

- Lee, M. K., Walters, F.S., Hart, H., Palekar, N. & Chen, J. S. (2003) The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**,4648–4657
- Lid, J. & Lid, D.T. (2005). Norsk flora. Det Norske Samlaget, Oslo. 7. utgave. ISBN: 82-521-6029-8. 1230s.
- Meadow, R. (2007). *Expected effects and side effects of approval for the use of maize MON 810 on target and non-target arthropods in and around maize fields in Norway*. Rapport fra Bioforsk Plantehelsetse. 9 s.
- Moreno-Fierros, L., Ruiz-Medina, E.J., Esquivel, R., López-Revilla, R., Piña-Cruz, S. (2003). Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides in mice. *Scand. J. Immunol.*, **57**, 45-55.
- Netherwood, T., Martín-Orúe, S.M., O'Donnell, A.G., Gockling, S., Graham, J., Mathers, J.C. & Gilbert, H.J. (2004). Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nature Biotechnology*, **22**, 204-209.
- Nielsen, K.M., van Elsas, J.D. & Smalla, K. (2000). Transformation of *Acinetobacter* sp. 13(pFG4delta*nptII*) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Applied Environmental Microbiology*, **66**, 1237-42.
- Nielsen, K.M. (2003). An assessment of factors affecting the likelihood of horizontal transfer of recombinant plant DNA to bacterial recipients in the soil and rhizosphere. *Collection of Biosafety Reviews*, **1**, 96-149.
- Nielsen, K.M. & Townsend, J. P. (2004). Monitoring and modeling horizontal gene transfer. *Nature Biotechnology*, **22**(9):1110-1114
- OECD (1998). OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. Number 1. ENV/MC/CHEM (98)17.
[http://www.olis.oecd.org/olis/1998doc.nsf/LinkTo/NT00000C5A/\\$FILE/01E88455.PDF](http://www.olis.oecd.org/olis/1998doc.nsf/LinkTo/NT00000C5A/$FILE/01E88455.PDF)
- OECD (2002). Consensus Document on Compositional Consideration for New Varieties of Maize (*Zea Mays*): key Food and Feed Nutrients, Anti-nutrients and Secondary Plant Metabolites, No. 6, series on Safety of Novel Foods and Feeds.
- OECD (2003). Consensus Document on the biology of *Zea mays* subsp. *Mays* (Maize). *Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology (ENV/JM/MONO, No. 27*, 1-49.
- Prasad, S.S.S.V. & Shethna, Y.I. (1975). Enhancement of immune response by the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **62**, 517-521.
- Rojas-Hernández, S., Rodríguez-Monroy, M.A., López-Revilla, R., Reséndiz-Albor, A.A., Moreno-Fierros, L. (2004). Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infect. Immun.*, **72**, 4368-4375.

- Schubbert, G.W., Lettmann, C. & Doerfler, W. (1994). Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Molecular & general Genetics*, **242**, 495-504.
- Sena, J. A. D., Carmen Sara Herná ndez-Rodríguez,, C.S. & Ferre, J. (2009). Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A Proteins with *Spodoptera frugiperda* Midgut Binding Sites. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**(7), 2236-2237.
- Shi Y., Ma W., Yuan M., Sun S. & Pang Y. (2007). Cloning of *vip1/vip2* genes and expression of Vip1Ca/Vip2Ac proteins in *Bacillus thuringiensis*. *World J Microbiol Biotechnol.*, **23**, 501–507.
- Siehl, D.L., Castle, L.A., Gorton, R., Chen, Y.H., Bertain, S., Cho, H-J., Keenan, R., Liu, D. & Lassner, M.W. (2005). Evolution of a microbial acetyltransferase for modification of glyphosate: a novel tolerance strategy. *Pest Management Science*, **61**, 235-240.
- 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.
- US EPA (2009). *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa20 Insecticidal Protein and the Genetic Material Necessary for Its Production (via Elements of Vector pNOV1300) in Event MIR162 Maize (OECD Unique Identifier: SYN-IR162-4) Biopesticides Registration Action Document. PC Code: 006599.
http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/ingredients/tech_docs/brad_006599.pdf
- US EPA 40 CFR PART 160. USA Environmental Protection Agency Good Laboratory Practices - 40 CFR Part 160
<http://www.epa.gov/compliance/monitoring/programs/fifra/glp.html>
- van Frankenhuyzen, K & Nystrom, C (2002). The *Bacillus thuringiensis* toxin specificity database.
http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/
- van Wijk, F. & Knippels, L. (2007). Initiating mechanisms of food allergy: oral tolerance versus allergic sensitization,. *Biomed. Pharmacother.*, **61**, 8–20.
- Vazquez-Padron, R.I., Martinez-Gil, A.F., Ayra-Pardo, C., Gonzalez-Cabrera, J., Prieto-Samsonov, D.L., De la Riva, G.A. (1998). Biochemical characterization of the third domain from *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. *Biochem. Mol. Biol Int.*, **45**(5), 1011-20.
- Vazquez, R.I., 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, R.I., Gonzales-Cabrera, J. Garcia-Tovar, C., Neri-Bazan, L., Lopez-Revilla, R., Hernandez, M., Moreno-Fierro, L., De la Riva, G.A. (2000a). Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. kurstaki HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **271**, 54-8.
- Vazquez-Padron, R.I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazan, L., Martinez-Gil, A.F., De La-Riva, G.A., Lopez-Revilla, R., (2000b). Characterization of the mucosal and systemic immune response induced by Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **33**, 147-55.
- VKM (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. Opinion 05/302-1-final. Norwegian Scientific Committee for Food Safety, Oslo, Norway. 62 p.

- VKM (2006). *Uttalelse om Monsanto's genmodifiserte mais GA21 (EFSA/GMO/UK/2005/19)*. 06/309-endelig. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.
http://www.vkm.no/eway/default.aspx?pid=277&trg=Content_6301&Main_6177=6301:0:31,2365:1:0:0:::0:0&Content_6301=6187:1670854::1:6336:29:::0:0
- VKM (2007). *Risikovurdering av genmodifisert åkermais Bt11 fra Syngenta (C/UK/94/M3/1)*. 05/308-endelig. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.
http://www.vkm.no/eway/default.aspx?pid=277&trg=Content_6301&Main_6177=6301:0:31,2365:1:0:0:::0:0&Content_6301=6187:1670858::1:6336:28:::0:0
- VKM (2008). *Helse- og miljørisikovurdering av genmodifisert maishybrid Bt11 x MIR604 x GA21 fra Syngenta Seeds Inc. (EFSA/GMO/UK/2008/56)*. 08/332-endelig. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.
http://www.vkm.no/eway/default.aspx?pid=277&trg=Content_6301&Main_6177=6301:0:31,2365:1:0:0:::0:0&Content_6301=6187:1671358::1:6308:4:::0:0
- VKM (2009a). *Helse- og miljørisikovurdering av genmodifisert mais GA21 fra Syngenta Seeds (EFSA/GMO/UK/2008/60)*. 09/305 *Utkast*. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.
- VKM (2009b). *Helse- og miljørisikovurdering av genmodifisert mais Bt11 x GA21 fra Syngenta Seeds (EFSA/GMO/UK/2007/49)*. 08/316-endelig. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.
http://www.vkm.no/eway/default.aspx?pid=277&trg=Content_6301&Main_6177=6301:0:31,2365:1:0:0:::0:0&Content_6301=6187:1684329::1:6344:8:::0:0
- VKM (2009c). *Helse- og miljørisikovurdering av genmodifisert mais Bt11 x MIR604 fra Syngenta Seeds (EFSA/GMO/UK/2007/50)*. 08/317-endelig. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.
http://www.vkm.no/eway/default.aspx?pid=277&trg=Content_6301&Main_6177=6301:0:31,2365:1:0:0:::0:0&Content_6301=6187:1684349::1:6344:7:::0:0
- VKM (2009d). *Helse- og miljørisikovurdering av genmodifisert mais MIR604x GA21 fra Syngenta Seeds (EFSA/GMO/UK/2007/48)*. 08/319-endelig. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.
http://www.vkm.no/eway/default.aspx?pid=277&trg=Content_6301&Main_6177=6301:0:31,2365:1:0:0:::0:0&Content_6301=6187:1684349::1:6344:7:::0:0
- Warman, P.R. & Havard, K.A. (1998) Yield, vitamin and mineral content of organically and conventionally grow potatoes and sweet corn. *Agric. Ecosyst. Environ.* **68**, 207–216.
- Yu, C.G., Mullins, M.A., Warren, G.W., Koziel, M.G. & Estruch, J.J. (1997). The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(2), 532– 536.