



**Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer i  
Vitenskapskomiteen for mattrygghet  
09.11.07**

**Genmodifisert maislinje MON810**

**SAMMENDRAG**

Vurderingen av den insektresistente maislinjen MON 810 er utført av Faggruppe for genmodifiserte organismer under Vitenskapskomiteen for mattrygghet. Vitenskapskomiteen for mattrygghet er blitt bedt av Direktoratet for naturforvaltning om å foreta en vurdering av miljørisiko i forbindelse med nasjonal sluttbehandling av søknad om godkjenning av MON 810 for alle bruksområder.

Vurderingen av den genmodifiserte maisen er basert på dokumentasjon fra EUs tidligere Vitenskapskomité for planter (SCP 1998), og nyere dokumentasjon fra EFSA som er relatert til søknadene om godkjenning av maishybridene MON 863 x MON 810 og MON 88017 x MON 810 under forordning 1829/2003/EF (EFSA/GMO/DE/2004/03; EFSA/GMO/CZ/2006/33). Denne informasjonen er tilgjengelig på EFSA's nettside GMO EFSA.net. I tillegg er det også benyttet informasjon fra uavhengige vitenskapelige publikasjoner i vurderingen.

Miljørisikovurderingen av MON 810 er gjort overensstemmelse med kravene i genteknologiloven og forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven, samt kravene i direktiv 90/220/EF med annekser. Retningslinjene i EUs nye utsetningsdirektiv 2001/18/EF (vedlegg 2, 3 og 3B), nedfelt i EFSA's retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter, er imidlertid også lagt til grunn for vurderingen (EFSA 2006). Miljørisikovurderingen av MON 810 er gjort i henhold til tiltenkt bruk (dyrking, fôr- og matvarer). Vurderingen omfatter transformasjonsprosess og vektorkonstruksjon, karakterisering og nedarving av genkonstruksjonen, agronomiske egenskaper, potensiale for ikke intenderte effekter på fitness, genoverføring, samspill med målorganismer og ikke-målorganismer, samt mulig samspill med abiotisk miljø.

Maislinjen MON 810 inneholder genet *CryIA(b)* fra bakterien *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-1. Genet koder for et  $\delta$ -endotoksin som gir resistens mot enkelte skadeinsekter i ordenen *Lepidoptera*, nærmere bestemt maispyralide (*Ostrinia nubilalis*) og enkelte arter i slekten *Sesamia*.

MON 810 skal, ifølge søknad fra Monsanto, ikke inneholde andre transgener fra det opprinnelige genkonstruksjonset enn deler av 35S promoter, *ZmHsp70* og 2.8 kb av 3' enden av *CryIA(b)* genet, nok til å gi et funksjonelt genprodukt som gjør MON 810 motstandsdyktig mot maispyralide og enkelte nattflyarter. Vi vurderer det som sannsynlig at funksjonelle, hele antibiotikaresistensgener ikke finnes i MON 810.

Med unntak for *Bt*-resistens, viser feltforsøk i Europa og USA ingen signifikante forskjeller mellom MON 810 og konvensjonelle linjer med hensyn på agronomiske karakterer. Det vurderes ikke å være økt risiko knyttet til spredning, etablering og invasjon av maislinjen i naturlige habitater, eller utvikling av ugraspopulasjoner i dyrkingsmiljø sammenlignet med konvensjonelle sorter.

Det er ingen stedegne eller introduserte viltvoksende arter i den europeiske flora som mais kan hybridisere med, og vertikal genoverføring vil være knyttet til krysspollinering med konvensjonelle og eventuelle økologiske sorter. I tillegg vil utilsiktet innblanding av genmodifisert materiale i såvare representere en mulig spredningsvei for transgener mellom ulike dyrkingssystemer

I Norge er det registrert enkeltfunn av målorganismen *O. nubilalis*, men arten er ikke rapportert som skadegjører. Det er ikke gjort observasjoner av *Sesamia*-arter i Norge. Det har ikke vært søknader om sertifisering av insekticider mot disse herbivorene.

Noen laboratoriestudier viser skadelige effekter av CRY1A(b)-toksinet fra MON 810 på ikke-målorganismer av artropoder som lever på eller i nærheten av maisplanter. Redusert størrelse av parasitoider og redusert antall av predatorer og parasitoider, som er vist i enkelte undersøkelser, synes å være relatert til lavere forekomst av, eller redusert vitalitet hos vertsinsektene. Det er fortsatt noe usikkerhet knyttet til effekter av inntak av pollen fra *Bt*-mais på enkelte ikke-målorganismer. Dette er imidlertid en risiko som bør avveies mot dokumenterte, negative effekter av sprøyting med andre syntetiske insekticider.

Utvikling av resistens mot *Bt*-toksinet kan utvikles raskere når toksinet er tilstede i planten gjennom hele vekstsesongen. Slik resistens vil også gi resistens for sprøyting med *Bt*-insekticider. I tillegg til målorganismene, kan også andre herbivorer utvikle resistens mot toksinet. I tilfelle med polyfage herbivorer kan dette også medføre resistensproblemer i andre kulturer der *Bt*-preparater brukes. For å motvirke resistensutvikling anbefales det å sette av refugearealer med konvensjonell mais i tilknytning til arealer med *Bt*-mais. Dette gjøres enten ved at 5 % av maisarealene består av usprøytete, ikke-transgene sorter, eller ved at konvensjonell mais, som behandles med ikke-*Bt*-insekticider, utgjør 20 % av dyrkingsarealene.

Basert på de oppgitte egenskaper til MON 810, vedlagt dokumentasjon, samt informasjon i åpen litteratur vurderes risiko for negative effekter på jordlevende organismer til å være minimal. Ved anbefalt dyrkingspraksis med vekstskifte vil potensielle effekter på jordlevende organismer og jordmiljø trolig være ubetydelige.

#### Konklusjon:

Det er kunnskapsmangler relatert til effekter av *Bt*-toksinet på ikke-målgrupper av terrestriske og akvatiske organismer. I norsk sammenheng, og sett i forhold til annen mais, finner likevel faggruppen at maislinjen MON 810 har en lav risiko for effekter på miljøet.

**Nøkkelord:** Genmodifisert mais, MON 810, insektresistens, *CryI A(b)*, miljøeffekter

## INNHOLDSFORTEGNELSE

SAMMENDRAG .....	1
BAKGRUNN .....	3
OPPDRAK FRA DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING .....	4
MILJØRISIKOVURDERING .....	5
KONKLUSJON.....	25
VURDERT AV (MEDLEMMER AV FAGGRUPPE GENMODIFISERTE ORGANISMER) .....	26
TAKK TIL .....	26
TILLEGGSSINFORMASJON .....	27
REFERANSER .....	34

## BAKGRUNN

Faggruppe for genmodifiserte organismer under Vitenskapskomiteen for mattrygghet er blitt bedt av Direktoratet for naturforvaltning om å foreta en vurdering av miljørisiko i forbindelse med nasjonal sluttbehandling av søknad om godkjenning av insektresistent maislinje MON 810 for alle bruksområder.

MON 810 er godkjent som genmodifisert organisme i EU under direktiv 90/220/EF, med bruksområder dyrking, frøavl, import, videreforedling og fôr. Søknaden ble anbefalt og fremmet av franske myndigheter, og sendt på høring til EØS-landene i juni 1996, med frist på 60 dager for kommentarer og innspill. EUs tidligere Vitenskapskomité for planter ('Scientific Committee on Plants') ga sin uttalelse til søknaden i februar 1998, og godkjenning for omsetning ble gitt 22. april 1998. Godkjenningen omfatter både den genmodifiserte maislinjen, og alle avledete sorter (innavl linjer, hybrider) produsert ved hjelp av konvensjonell foredlingsmetodikk.

Maislinjen er også godkjent under den forenklede prosedyren i Novel Foodsforordningen (EF) Nr. 258/97 til bruk som avledete næringsmidler og næringsmiddelingsredienser. Den er videre notifisert som eksisterende produkt under forordning 1829/2003/EF, artikkel 8 og 20, med bruksområder prosesserte næringsmidler, tilsetningsstoffer til næringsmidler, fôrvarer (både i prosessert form og som levende organisme), samt tilsetningsstoffer til fôr.

Flere medlemsland har nedlagt nasjonale forbud mot utsetting av maislinjen MON 810 i henhold til Art. 23 i direktiv 2001/18/EF (sikkerhetsklausulen). I forbindelse med at Østerrike og Ungarn har påberopt seg sikkerhetsklausulen har EFSA's GMO-panel foretatt en ny vurdering av den aktuelle maislinjen (EFSA 2004a; 2005).

Godkjenningen av MON 810 gikk ut 18. april 2007, og Monsanto har levert søknad om fornyet godkjenning av maislinjen under forordning 1829/2003/EF ([http://ec.europa.eu/food/dyna/gm\\_register/index\\_en.cfm](http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm)). Søknaden omfatter bruksområdene dyrking,

mat, fôr, import og prosessering, og er nå under utsjekking av EFSA. Søknaden er ikke tilgjengelig på EFSA-nett pr. 23. oktober 2007.

Til sammen 31 avledete sorter (hybrider/innavlede linjer) fra MON 810 er tatt opp på EUs felles sortliste over landbruksplanter, samt de nasjonale sortslistene i Spania, Frankrike og Tyskland. I tillegg kommer 10 som bare er oppført på den nasjonale sortlisten i Spania.

I Norge ble MON 810 innmeldt som prosessert fôrvare under den nasjonale overgangsordningen for eksisterende GM-produkter 15. mars 2006 (jfr. fôrvareforskriftens § 7a), og er tillatt å omsette på det norske markedet. Notifiseringen gjelder fôrvarer både til landdyr og til oppdrettsfisk, men er foreløpig ikke offentliggjort av Mattilsynet.

Utenfor EU/EØS-området er maislinjen MON 810 godkjent for dyrking i USA, Canada, Uruguay, Argentina, Sør-Afrika, Filippinene og Japan (Agbios 2007). Totalt er maislinjen godkjent for import og ulik bruk, unntatt dyrking, i 13 land utenfor EU.

## OPPDRAK FRA DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING

Vitenskapskomiteen for mattrygghet ble i brev av 3. juli 2007 bedt av Direktoratet for naturforvaltning om å foreta en utredning av miljørisiko ved en eventuell godkjenning av den genmodifiserte maislinjen MON 810 (C/F/95/12/02) til bruk som annen mais (alle bruksområder). Bakgrunnen for oppdraget er at Norge i forbindelse med implementering av EUs regelverk på genmodifisert mat og fôr, må ta endelig stilling til om søknaden skal innvilges også her i landet. Oppdraget omfatter forhold knyttet til miljørisiko som gjelder for alle land som omfattes av godkjenningen (EØS-området), og forhold knyttet til miljørisiko som vil være spesielt viktige i Norge.

I Norge ble søknaden vurdert av Nasjonalt folkehelseinstitutt i 1996 i forhold til risiko for allergi, effekter ved direkte håndtering, bruk som næringsmiddel og miljømessige forhold av helsemessig betydning. I januar 2007 leverte Faggruppe for genmodifiserte organismer under Vitenskapskomiteen for mattrygghet en vurdering av helseaspekter knyttet til bruk av maislinjen som næringsmiddel og fôrvare (VKM 2007).

*Produktet som ønskes vurdert:*

Genmodifisert maislinje MON 810 fra Monsanto Services International S.A/N.V.

Unik kode: MON-ØØ81Ø-6.

Notifikasjonsnummer i EU: C/F/95/12-02

Status i EU: Godkjent for markedsføring under direktivene 90/220/EF og 258/97/EF i 1998. Innmeldt som eksisterende produkt under forordning 1829/2003/EF (art. 8 og 20) i 2004.

# MILJØRISIKOVURDERING

## 1. Innledning

Miljørisikovurderingen av den genmodifiserte maisen er i hovedsak basert på dokumentasjon fra EUs tidligere Vitenskapskomité for planter (SCP 1998), og nyere dokumentasjon fra EFSA som er relatert til søknadene om godkjenning av maishybridene MON 863 x MON 810 og MON 88017 x MON 810 under forordning 1829/2003/EF (EFSA/GMO/DE/2004/03; EFSA/GMO/CZ/2006/33). Denne informasjonen er tilgjengelig på EFSAAs nettside GMO EFSA.net. I tillegg er det benyttet uavhengige vitenskapelige publikasjoner med referee i vurderingene. Rapporten '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' fra Bioforsk Plantehelse (Meadow 2007) ligger til grunn for vurderingene av potensiale for samspill med målorganismer og ikke-målorganismer.

Vurderingen av MON 810 er gjort i henhold til tiltenkt bruk, og i overensstemmelse med kravene i genteknologiloven og forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven, samt kravene i direktiv 90/220/EF med annekser. Retningslinjene i EUs nye utsetningsdirektiv 2001/18/EF (vedlegg 2, 3 og 3B), nedfelt i EFSAAs retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter, er imidlertid også lagt til grunn for vurderingen (EFSA 2006).

### 1.1. Beskrivelse av egenskap(er) og virkningsmekanismer

Den genmodifiserte maislinjen MON 810 uttrykker insekttoleranse. Bakgrunnen for insekttoleransen er at planten uttrykker en variant av bakterieproteinet CRYIA(b), som uttrykkes av *CryIA(b)*- genet. Dette er naturlige toksiner som gir planten toleranse mot larver i ordenen *Lepidoptera*, nærmere bestemt maispyralide (*Ostrinia nubilalis*) og arter i slekten *Sesamia* (nattflyfamilien). *CryIA(b)*- genet stammer fra jordbakterien *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

## 2. Molekylær karakterisering

Her gjør vi rede for transformeringsteknikk, dvs. hvordan transgenene er overført til maislinja MON 810. Videre gis det en oversikt over hva søker hevder finns av transgener (også kaldt cisgener) i YieldGard, størrelsen på disse, flankesekvenser og kopitall med Southern dokumentasjon. Vi fant ikke tilstrekkelig dokumentasjon i opprinnelig søknad fra 1996, og har derfor også brukt oppdatert informasjon angående MON 810 fra ny hybridsøknad MON 88017x MON 810.

### 2.1. Transformasjonsprosess og vektorkonstruksjon

Genoverføringen til MON 810 ble utført ved partikkelakselerasjon. Søknaden inneholder ikke informasjon om hvilken type overføringsmaskin ("genkanon") som er benyttet. En blanding av genkonstruksjonene PV-ZMBK07 og PV-ZMGT10 ble bundet til tungstein eller gullpartikler, vha calciumklorid og spermidin. Disse partiklenes høye tetthet er nødvendig for å kunne oppnå fart og kraft nok, til at disse genkonstruksjonene skal kunne penetrere plantenes cellevegger slik at genkonstruksjonene kommer inn i cytoplasmaet og inkorporeres i cellekjernenes kromosom. En rupture disk (liten plastikkplate) av en viss tykkelse brukes for å oppnå et visst trykk/kraft, før partiklene med genene skytes for å oppnå optimal penetrering av plantecellene avhengig av art og vevstypens celleveggresistens. Plastplaten dekket med partiklene skytes dermed mot et gitter, som lar

partiklene med genkonstruksjonene gå videre til plantecellene, som her var embryogene kallusceller. For vellykket overføring av genene på konstruktene, må både de normalt sirkulære plasmidene lineariseres, dvs fysisk kuttes, og ett kromosom fysisk åpnes for å oppnå integrering og stabil nedarvbar overføring av transgener (nå etter hvert kaldt cisgener) til plantecellene. Det har vist seg ved grundige analyser at sirkulære plasmidkonstrukt både lineariseres spontant og ofte ved såkalt illegal rekombinasjon mellom svært korte, like sekvenser mellom de mange konstrukt kopiene hver partikkel er dekket av. Det kalles illegal rekombinasjon, da normal rekombinasjon ved overkryssing i celsyklusens meiose forutsetter lange kromosomsegment med like gensekvenser for å unngå utilsiktet ny geninformasjon med kromosommutasjoner som vil bli resultatet om disse rekombinasjonene ikke foregår mellom like kromosomdelene og de samme genene. 35S promoteren har vist å være spesielt potent mht denne type illegal rekombinasjon, og når mange konstrukt inneholder flere kopier av denne har dette ført til utilsiktet sammensetning av gener under genoverføring. Partikkelakselerasjon er spesielt utsatt for denne typen mutasjoner. Det er også kjent at en som oftest får mange kopier av genkonstruktene satt sammen i samme locus ved denne type genoverføring som kan gi gensilencing og manglende proteinprodukt, til tross for at genene kan være til stedet i GMOen. Vi kommer tilbake til denne diskusjonen under den molekylære beskrivelsen av MON 810. Som oftest forventes en rekke innsatte fragmenter av genkonstruksjonene i enhver GMO, og som oftest på flere plasser i genomet. På hver plass kan genfragmenter av ulik størrelse sitte sammen i tandem og i revers orientering, som gjør at Southern alene gir en ufullstendig karakterisering av en GMO både mht innsatte fragmenter og kopitall. Søker hevder at plasmidet PV-ZMGT10 ikke finnes i MON 810 og at heller ingen fragmenter av plasmidet finnes. Vi kan ikke se at dette er tilstrekkelig dokumentert. Det presenteres kun Southern blot, hvor genomisk DNA fra MON 810 er kuttet med restriksjonsenzymet EcoRI og plasmidfragmentet for *CryIA(b)* er på 3464 bp, men med *NOS* fragmentet etter restriksjonssetet på vektoren ville det vært på 5,21 kb. Når det genomiske DNAet er kuttet med EcoRI kan ikke Southern si noe om *NOS* finnes inkorporert som klonet i konstruktet. Siden det er funnet hybridisering til et genomisk fragment på kun 5.5 Kb når genomisk MON 810 DNA er kuttet med restriksjonsenzymet NdeI, er det lite sannsynlig at hele genet ligger på dette genomiske fragmentet. Et enzym med sjeldnere kutting hadde gitt en bedre beskrivelse av MON 810. Videre er det ikke opplyst hvilken del av *CryIAb* genet som ikke er inkorporert på MON 810. Det er senere opplyst at innsatt *CryIA(b)*- gen er på 2,45 bp i hybridsøknaden MON88017xMON 810 (Hernández et al. 2003).

#### Plasmid PV-ZMGT10 genelementer og størrelser:

<i>E35S</i>	0,61 kb	Blomkål mosaikk virus ( <i>CaMV</i> ) promoter (Odell et al. 1985) med dobbel enhancer (Kay et al. 1987* feil ref. i søknaden som hevder den er publisert I 1985. stating 1985).
<i>ZmHsp70</i>	0,80 kb	Intron fra mais <i>Hsp70</i> genet (heat-shock protein) er til stede for å øke transkripsjonen og dermed nivået av gentranskriptet (Rochester et al. 1986).
<i>CTP2</i>	0,31 kb	Cloroplast transit peptid gensekvens isolert fra <i>A. thaliana</i> <i>EPSPS</i> (Klee & Rogers 1987), for å dirigere CP4 EPSPS proteinet til kloroplastene.
<i>CP4 EPSPS</i>	1,4 kb	Gensekvens som gir Glyphosat toleranse fra <i>A. thaliana</i> sp. stamme CP4 (Harrison et al. 1993) som kan brukes til seleksjon av transgene celler i kultur og senere til ugressbekjemping i genmodifiserte vekster under dyrking.
<i>CTP1</i>	0,26 kb	Cloroplast transit peptid gensekvens isolert fra det lille

		subenhetgenet for <i>ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase (SSUIA)</i> fra <i>A. thaliana</i> (Timko et al. 1988), for å dirigere GOX til kloroplaster.
<i>Gox</i>	1,3 kb	Gensekvensen koder for Glyfosat metaboliseringsenzymet Glyfosat oxidoreduktase (GOX), isolert fra <i>Achromobacter</i> sp. (ny klassifisering til <i>Ochrobacterium anthropi</i> ) stamme LBAA (Hallas et al. 1988; Barry et al. 1992; Barry et al. 1994).
<i>NOS 3'</i>	0,26 kb	Et 3'-område til <i>Nopalinsyntetase</i> genen som ikke blir translatert, men som terminerer transkript og som dirigerer polyadenylering (Fraley et al. 1983).
<i>lacZ</i>	0,24 kb	En del av <i>E. coli lac1</i> genets kodende sekvens som inneholder promoteren <i>Plac</i> og en delvis kodende sekvens for beta-D-galaktosidase eller <i>LacZ</i> gensekvens fra pUC119 (Yanisch-Perron et al. 1985).
<i>ori-pUC</i>	0,65 kb	Replikasjonsorigo som dirigerer replikasjon av plasmidet i <i>E. coli</i> (Vieira & Messing 1987).
<i>nptII</i>	0,79 kb	Genet for enzymet neomycin fosfotransferase type II (Beck et al. 1982).

Oversikt over plasmidet PV-ZMBK07s genelementer og størrelser:

<i>E35S</i>	0,61 kb	Blomkål mosaikk virus ( <i>CaMV</i> ) promoter (Odell et al. 1985) med dobbel enhancer (Kay et al. 1987).
<i>ZmHsp70</i>	0,80 kb	Intron fra mais <i>Hsp70</i> genen (heat-shock protein) er til stede for å øke transkripsjonen og dermed nivået av gentranskriptet (Rochester et al. 1986).
<i>cryIA(b)</i>	3,46 kb	Genet som koder for CRY1Ab proteinet (Fischhoff et al. 1987).
<i>NOS 3'</i>	0,26 kb	Et 3'-område til nopalinsyntetase genen som ikke blir translatert, men som terminerer transkript og som dirigerer polyadenylering (Fraley et al. 1983).
<i>lacZ</i>	0,24 kb	En del av <i>E. coli lac1</i> genets kodende sekvens som inneholder promoteren <i>Plac</i> og en delvis kodende sekvens for β-D-galaktosidase eller <i>LacZ</i> gensekvens fra pUC119 (Yanisch-Perron et al. 1985).
<i>ori-pUC</i>	0,65 kb	Replikasjonsorigo som dirigerer replikasjon av plasmidet i <i>E. coli</i> (Vieira & Messing 1987).
<i>nptII</i>	0,79 kb	Genet for enzymet neomycin fosfotransferase type II (Beck et al. 1982).

### Beskrivelse av genene i plasmidet PV-ZMBK07:

*E5S* promoteren binder RNA polymerase og initierer transkripsjon, men uttrykkes ikke som RNA og heller ikke som protein.

*ZmHsp70* genets intron er satt inn for å øke gentranskripsjonen av *CryIA(b)* genet. Intronet kommer fra mais og intron spleises ut av preRNAet og uttrykkes derfor ikke.

Deler av *CryIA(b)* genet er den eneste plasmidderiverte nukleotidesequensen som kunne påvises i maisplanten. Den delen av genet som er satt inn koder for et insektaktivt *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (B.t.k., som er en vanlig jordbakterie) protein. Det vanlige navnet på proteinet er CRYIA(b).

*LacZ* genets alfa område, koder for enzymet  $\beta$ -galaktosidase, som er et laktose-metaboliserende enzym fra *E. coli*. Enzymet katalyserer hydrolyse av laktose til sine enkelte monosakkarider. Det er ingen helsemessige betenkeligheter med dette enzymet da det er naturlig til stede i menneskers tarmbakterier.

*ori-pUC* området er replikasjonsgenet for pUC plasmidet, og dets funksjon er at plasmidet kan replikeres i *E. coli*. Replikasjon fra dette origo er begrenset til Enterobakterier og fungerer ikke i eukaryote celler.

*nptII* genet for enzymet neomycin fosfotransferase type II, som er i stand til å inaktivere kanamycin. *NptII*-genet anvendes i forbindelse med utvelgelse av de bakterielle celler som har fått satt inn plasmidkonstruktene med de gener som er ønsket overført til planten, fordi disse cellene også er resistente mot kanamycin. Genet uttrykkes ikke i maisplanten MON 810. Plasmidkonstruktet er vist i fig. 1 i tilleggsinformasjon.

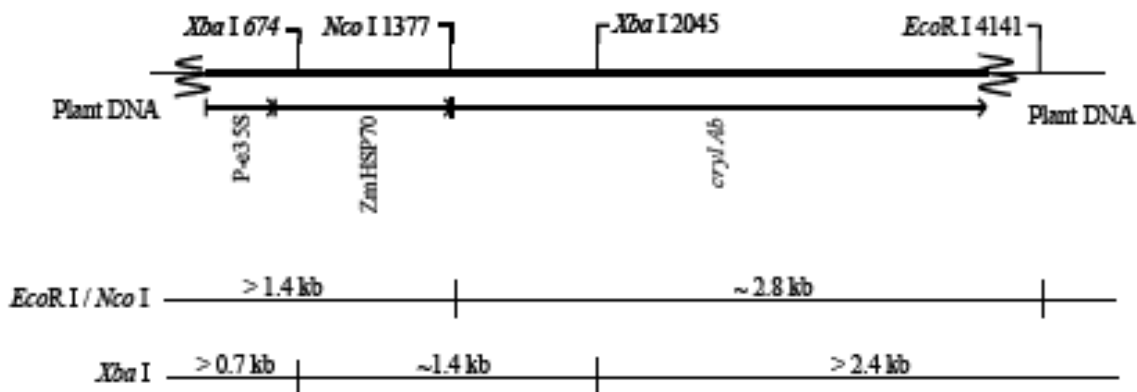
## **2.2. Karakterisering av geninnsettingen/ genkonstruksjonen i MON 810**

Opprinnelig informasjon og beskrivelse av transgen innsatt i MON 810 (Fig. 1 tilleggsinformasjon) er korrigert i hybridsøknad MON 88017 x MON 810. Informasjon fra begge søknadene er inkludert i risikovurderingen, siden vi antar at fornyet informasjon er korrekt.

I følge ny beskrivelse av MON 810 insertet i hybridsøknaden, vil EcoRI restriksjonssetet, som kutter når en gjør Southern hybridisering for å påvise rekombinant DNA fragment i MON 810, ikke kutte på tidligere hevdet plasmidvektor DNA, men i plantens genomiske DNA. Dette er i overensstemmelse med at 3' enden av *CryIA(b)* genet ikke finns i MON 810 (se hhv Fig. 3 umiddelbart under og vår fig. 2 og 1 i tilleggsinformasjon). DNA sekvensinformasjon er levert av Rigden et al. (2003) og flankesequensinformasjon av Borovkov et al. (2001).



Figure 3. Schematic representation of the insert in MON 810



A linear map of the insert in MON 810 including described genomic sequences 5' and 3' of the insert (Borovkov et al., 2001; Rigden and Reizer, 2005, respectively). Arrows indicate the direction of transcription of the gene cassettes. The restriction sites with the position relative to the known sequences of MON 810 for the enzymes used in the Southern blot analyses are identified. Sizes of predicted restriction fragments, calculated from the insert sequence and the reported 5' and 3' genomic sequences, are included for reference.

I Monsanto's fornyede søknad for hybriden MON 88017xMON 810 opplyses det at MON 810 har reduserte genfragmenter for både 35S promoter og *CryIA(b)* fra plasmidet PV-ZMBK07, redegjort for i tabell 2 under:

Table 2. Components of the inserted DNA fragment inherited from MON 810

Sequence	Size (Kb)	Source	Function
P-e35S	0.32	Cauliflower mosaic virus	DNA sequence derived from cauliflower mosaic virus (CaMV) containing a portion of the CaMV promoter with the duplicated enhancer region and 5' untranslated region.
<i>Zmhsp70</i>	0.81	Maize ( <i>Zea mays</i> L.)	DNA sequence derived from corn containing the intron sequence from the maize <i>hsp 70</i> gene (heat-shock protein) present to stabilize the level of gene transcription.
<i>cryIAb</i>	2.45	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	DNA sequence containing synthetic linker and a portion of the synthetic coding sequence for a variant of Cry1Ab1 protein from <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> .

### 2.3. Informasjon vedr. integrering i genomet og uttrykk av introduserte gener i MON810

Southern blot og PCR resultater brukes som dokumentasjon fra Monsanto for å beskrive innsatt genkonstruksjon i GM plantene. Denne dokumentasjon er fraværende med hensyn på opprinnelige genssekvenser på vektorer og kopi-tall av insert.. Det hevdes at den genmodifiserte linja har en tilnærmet fullstendig kopi av det rekombinante *cryIA(b)* DNA-fragmentet i maisens genom, noe som i senere tilleggsinformasjon er endret til å være en redusert 35S promoter så vel som et redusert *CryIA(b)* pga deleksjon av 3' enden av genet. Dette har Monsanto videre brukt som argument for at NOS 3' ikke finnes i MON 810, som ikke kan bevises i opprinnelig søknad, men senere tilleggsinformasjon støtter denne påstanden (Scanlon & Jennings 2004). Transgenintegrering er generelt godt studert og karakterisert (Puchta 1999; Kohli et al. 1998), og viser at en gjerne har en tottrinnsintegrering av transgen spesielt fra partikkelakselerert transformering. Denne tottrinnsprosessen består i illegal rekombinasjon mellom korte like sekvensbiter mellom transgen plasmidmolekylenes sekvenser. Det er vist at det er spesielt stor rekombinasjon mellom 35S sekvensene. Dette kan ha skjedd i denne transformasjonen siden MON 810 er transformert med to ulike konstrukt, hvorav begge hadde 35S promotersekvenser og ZMGT10 sågar to 35S promotere som skulle styre to ulike gener. Den første integreringen er av et mulig plasmidfragment som består av slike sammensatte plasmidvektorer med småfragmenter av plantekromosomalt DNA mellom dem. Det andre integreringstrinnet består av integrering av flere transgener i samme området med mulig påfølgende rekombinasjon mellom transgen og planteDNAet (Kohli et al. 1998; Register et al. 1994). Sekvensering og BLAST til maisgenomsekvenser støtter antagelsen av at det har skjedd en rekombinasjon mellom transgen og flankesekvensene i MON 810, som kan forklare hvorfor mye av plasmidvektor DNAet er fjernet og en har fått satt sammen nye deler av maismorlinjas kromosomfragment etter genmodifiseringen av MON 810 (Hernández et al. 2003; Rudi et al. 2002). Endelig beskrivelse av innsatt *cryIA(b)* gen og dets størrelse er presentert av Hernández et al. 2003 (Vår Fig 3 og 4 i tilleggsinformasjon).

### 2.4. Southern hybridisering resultat for representative gener på konstruktene PV-ZMBK07 og PV-ZMGT10

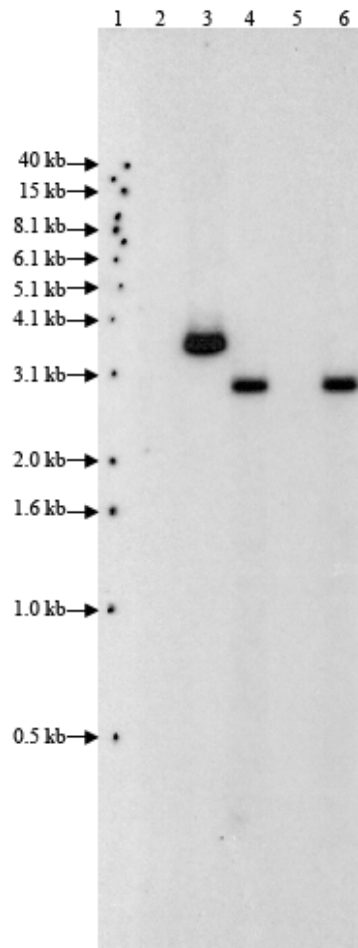
*Hybridisering med konstruktet PV-ZMBK07 på genomisk DNA kuttet med NdeI for å bestemme uspesifikt kopitalt av genkonstruksjon inkorporert i MON 810 genomet.*

Det finns ikke noe NdeI restriksjonssete i vektorene brukt ved transformering av MON 810, så kutting med dette enzymet vil kutte i genomisk DNA utenfor transgen integrering og således gi kopitalt for integreringsseter i MON 810 med PV-ZMBK07 som probe. Dette forutsetter at Southern analysen utføres med tilstrekkelig genomisk DNA, en funksjonell probe, tilstrekkelig hybridiserings- og eksponeringstid til film, og presenteres med bilde med tydelig hybridiserende bånd uten høy bakgrunnsstøy. Fig. 2 under tilfredsstillende ikke disse kravene, så vi kan ikke bedømme kopitallet i MON 810 ut ifra dokumentasjonen i søknaden om godkjenning av MON 810 (Appendix I "Molecular analyses of insect-protected maize line MON 810" Monsanto technical report MSL-14382) (Kania et al. 1995). Det er for mye bakgrunnsstøy til at en kan bedømme evt. hybridiserende bånd på Southernblottet på Fig 2 under.

Søker hevder det er et uspesifikt bånd som hybridiserer på omtrent 21 kb, og et spesifikt på omtrent 5,5 kb. Den totale lengden på det klonede *CryIA(b)* med promoter og NOS terminator på konstruktet er 5203 bp kuttet med NotI. Når genomisk DNA er kuttet utenfor konstruktet, altså i opprinnelig genomsekvens, vil et fragment på kun 5.5kb inneholde et fragment av hele konstruktet som totalt er på 7794 bp. Ved hybridisering til hele konstruktet kan det være en helt annen del av konstruktet det er målt kopitalt av, enn *CryIA(b)* genet av interesse.

Southern blottet presentert i hybridsøknaden med MON 810 under er vedlagt da det er mye bedre og informativt, se Fig. 5:

**Figure 5. Southern blot analysis of MON 88017 x MON 810: testing for the presence of MON 810**



Genomic DNA digested with *EcoR* I and *Nco* I probed with ~900 bases of the *cry1Ab* coding sequence.

Ten micrograms of test and control genomic DNA extracted from grain were digested with *EcoR* I and *Nco* I. The blot was probed with ~900 bases of <sup>32</sup>P-labeled *cry1Ab* coding sequence.

Lane designations are as follows:

- Lane 1: 1 kb extension ladder (Invitrogen)
- Lane 2: Non-transgenic LH59 x LH198
- Lane 3: Non-transgenic LH59 x LH198 spiked with ~24 pg of PV-ZMBK07
- Lane 4: MON 810
- Lane 5: MON 88017
- Lane 6: MON 88017 x MON 810

→ Symbol denotes sizes obtained from molecular weight markers on ethidium stained gel.

#### *Spesifikk hybridisering med CryIA(b) for deteksjon i MON 810*

Genomisk DNA fra MON 810 og negativ kontroll MON818, ble kuttet med enzymene *Nco*I og *Eco*RI og hybridisert med en radioaktiv merket del av *CryIA(b)* (vår Fig. 6 i tilleggsmåling). På konstruktet PV-ZMBK07 tilsvarer dette fragmentet som inneholder *CryIA(b)* 3464 bp. I spor 1 på

gelen viser hybridisering til genet et fragment som er større enn det forventede båndet på 3,46 kb, og en rekke mindre bånd som hevdes å være resultat av uspesifikk hybridisering. Det positive båndets overraskende store størrelse, forklares med *manglende blanding av konstruktet med genomisk DNA*, noe som syntes kryptisk etter vårt skjønn. Den negative kontrollen i spor 2 viser ingen hybridisering, mens MON 810 viser ett hybridiserende bånd på 3,1 kb (oppgitt str. i opprinnelig søknad, senere redusert til 2.8 kb i hybridsøknader), som tilsier at *CryIA(b)* genet inkorporert er mindre enn konstruktets klonede versjon. Søker hevder dette fragmentet er tilstrekkelig til å kode for et insektbekjempende aktivt protein (Höfte et al. 1986), selv om et Southern hybridisert med hele genet ikke kan bekrefte hvilken del som er til stede i MON 810. Western ble utført for å avdekke det aktive proteinfragmentet og bekreftet tilstedeværelse av det forventede trypsinresistente core proteinet (ca 63 kD, vår Fig. 9 spor 10, tilleggsinformasjon).

### ***CP4EPSPS***

Begge plasmidene PV-ZMBK07 og PV-ZMGT10, og MON 810 DNA ble kuttet med restriksjonsenzymene NcoI og BamHI, for angivelig å frigjøre *CP4EPSPS* genet. Disse enzymenes sekvenser på plasmidkonstruktet kutter ut et fragment på 3089 bp, hvorav bare 1 336 bp utgjør genet med terminator. Kutting med NotI ville derimot ha frigjort hele genet og lite annet vektormateriale. MON 810 gav ingen hybridisering til *CP4EPSPS* genet (vår Fig. 7 spor 2 tilleggsinformasjon), og ELISA bekreftet videre at det ikke kunne detekteres noe proteinprodukt for genet i MON 810, som videre ble bekreftet vha Western hybridisering. Det virker troverdig at *CP4EPSPS* genet ikke finnes i MON 810.

### ***Gox***

Begge plasmidene PV-ZMBK07 og PV-ZMGT10, og MON 810 DNA ble kuttet med restriksjonsenzymene NcoI og BamHI, for angivelig å frigjøre *Gox* genet. Disse enzymenes sekvenser på plasmidkonstruktet kutter ut et fragment på 3128 bp, hvorav bare 1 578 bp utgjør genet med terminator. Kutting med NcoI og EcoRI ville derimot ha frigjort genet, dog uten terminator med fullstendig EcoRI kutting, på 1302 bp. Southern hybridisering til MON 810 med *Gox* genet gav ikke hybridiserende signal (vår Fig 8 spor 4, tilleggsinformasjon), og ELISA bekreftet videre at det ikke kunne detekteres noe proteinprodukt for genet i MON 810, som videre ble bekreftet vha Western hybridisering (Sanders et al. 1995). Det virker troverdig at *Gox* genet ikke finnes i MON 810.

### ***NptII***

Enzymene NcoI og EcoRI ble brukt for å kutte ut *NptII* genet fra konstruktene PV-ZMBK07 og PV-ZMGT10, som genererer to fragmenter for hvert konstrukt da det er et NcoI sete i *NptII* genet på begge konstruktene på hhv 2529 bp og 1801 bp for PV-ZMBK07, og 1550 og 3087 bp for PV-ZMGT10. Da restriksjonskutting med NcoI klipper opp genene betyr det at en får svakere hybridisering til fullengde probe på Southern hybridisering. Kutting med NotI hadde vært bedre og ville gitt sikrere resultat. Med hybridisering til *NptII* genprobe gav plasmidkonstruktene de forventede båndene på hhv 2,5 og 1,8, og 1,6 og 3,1 kb (vår Fig 6 tilleggsinformasjon). Samme Southern blot ble stripped for hybridiserende probe og rehybridisert med *Hsp70* radioaktivt merket genfragment. Det ble ikke detektert hybridisering til disse *NptII* fragmentene i MON 810, som kan forklares med manglende integrert *NptII* gen fra transformeringen eller for svake signal til at de er detektert. Det er for øvrig dårlig kvalitet med hevdet uspesifikk binding og høy bakgrunn på vedlagt Southern film, så dette er for dårlig dokumentert til å vise manglende tilstedeværelse av genet i MON 810.

### ***ZmHsp70***

Da dette genet er klonet fra mais opprinnelig, må en først kartlegge hybridisering til endogent(e) gen, for deretter å lete etter evt. transgen integrert genkonstruksjon i gitt bakgrunn for MON 810 (vår Fig. 8

tilleggsinformasjon). Alle maislinjene testet har to endogene bånd når hybridisert med *Hsp70*, på 1,2 og 1,5 kb. Plasmidet PV-ZMBK07 har i tillegg ett hybridiserende fragment på 2,5 kb som stemmer med hva en forventer fra plasmidkartet når restriksjonskutta med *NcoI* og *EcoRI*, og PV-ZMGT10 to fragment på hhv 3,0 (3087 bp) og 2,0 (2030 bp) kb. MON 810 sporet på Southern gelen skal i følge søker inneholde et hybridiserende *Hsp70* fragment på 8 kb, men da det er lite DNA på gelen er dette fragmentet svært svakt. Dette er ikke tilstrekkelig for å vise tilstedeværelse av denne delen av konstruktet, som ellers sannsynligvis er til stede for siden MON 810 har aktivt *CRYIA(b)* protein.. Hvis det finns et 8,0 kb fragment i MON 810, viser dette samtidig at genet *CryIA(b)* ikke har *EcoRI* setet på plass 5073, som støtter søkers tidligere dokumentasjon på manglende 3' bit av *Cry* genet. Videre støtter det også manglende *NptII* gen med funksjonelt *NcoI* sete på 6874 bp. Dette Southern bildet har en mye bedre kvalitet enn det som skulle vise manglende *NptII* i MON 810, selv om den lave konsentrasjonen av DNA i MON 810 gjør det vanskelig å dokumentere både fravær og innhold av genbiter fra genkonstruksjonene med denne Southern analysen (gelen).

## 2.5. Nedarving og stabilitet av genkonstruksjonen/innsatt DNA

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

## 2.6. Konklusjon

Uten oppklarende tilleggsinformasjon fra nyere søknader relatert til hybridene MON 863 x MON 810 og MON 88017 x MON 810 ville det ikke være mulig å verifisere påstandene om transgen integrering, kopitall av transgen og vurdere om innholdet av transgener i genkonstruksjonet er tilstrekkelig dokumentert. Likevel, med den tilgjengelige informasjonen som finnes i dag, er det sannsynlig at MON 810 inneholder en ufullstendig og aktiv kopi av *CryIA(b)*genet styrt av en forminskert 35S promoter med en *ZmHsp70* intronsekvens imellom disse.

## 3. Maisdyrking i Norge

Norge er i utkanten av dyrkingsområdet for mais, og dyrkingsomfanget er svært begrenset. Tall fra 2006 viser at det ble dyrket 960 dekar sukkermais til konsum, og 3000-3500 daa med fôrmais (SSB 2007; Felleskjøpet). Det er ikke registrert produksjon av økologisk mais eller maisarealer under omlegging til økologisk drift (<http://www.debio.no>). Maisproduksjonen er hovedsakelig lokalisert til områdene rundt Oslofjorden og i Rogaland. Interessen for dyrking av mais til fôr har imidlertid vært økende de siste årene. Mais er en lite arbeidskrevende kultur, og nye og tidligere sorter, samt positive resultater av plastlegging etter såing, har gjort at flere dyrkere ønsker å supplere tradisjonelt grovfôr med surfôr av mais. Når vekstsesongen er lang nok gir mais store avlinger og et godt, smakelig og næringsrikt fôr som kan øke grovfôropptaket. Blir imidlertid vekstsesongen for kort, slik at kolbene ikke får tid til å utvikle seg, kan fôrenhetskonsentrasjonen bli svært lav (0,75 FEm/kg TS; <http://www.grovfôrnett.no>).

I en undersøkelse av potensialet for og risiko for avlingssvikt ved dyrking av fôrmais i marginale områder, har Bakken et al. (2005) testet et utvalg tidlige sorter på ulike lokaliteter i Sør- og Midt-Norge. Konklusjonen på undersøkelsen er at med dagens sortsmateriale er fôrmaisproduksjon i

Trøndelag og Rogaland er et risikoforetak, også dersom en tar i bruk intensive dyrkingsmetoder. Ut fra resultatene i undersøkelsen vil ikke gode avlinger av tilstrekkelig kvalitet være års sikker selv i de beste jordbruksområdene langs Oslofjorden. Klimaendringer, som medfører lengre vekstsesong og høyere gjennomsnittstemperaturer, kan imidlertid utvide dyrkingsarealet for mais i Norge.

#### 4. Agronomiske egenskaper, G x E- samspill

Søker opplyser at det er gjennomført feltforsøk med MON 810 og avkomstlinjer på 18 ulike forsøkssteder i Italia og Frankrike i 1994 og 1995, og over 60 steder i USA i perioden 1993-1995. Data som presenteres fra disse forsøkene er i hovedsak relatert til sammenligninger av ernæringsmessige komponenter i blad, fôr og frø/korn, samt uttrykk av CRY1A(b)-protein. I tillegg opplyses det at det er foretatt registreringer av agronomiske karakterer som avling, spirehastighet, frøkvile, vegetativ vekst, reproduksjonsegenskaper, samt sjukdoms- og insektresistens for vurdering av agronomisk ekvivalens i noen av disse forsøkene.

I søknaden presenteres kun resultater fra spiretester (i form av gjennomsnitt og variasjonsområde) fra en vekstsesong (1994) og 5 lokaliteter i USA. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom MON 810 og kontrollinjer med hensyn på spireprosent eller frøkvile. Visuelle observasjoner av vegetativ vekst og utvikling i feltforsøk i årene 1993-1995 viser ingen forskjeller mellom den transgene linjen og kontrollplanter (umodifiserte foreldrelinjer og maislinjer med tilsvarende genetisk bakgrunn). Det er heller ikke påvist endringer i reproduksjonsegenskaper, eller avling, der kontrollinjen ble behandlet med kommersielle insekticider. I følge søknaden er det, med unntak av toleranse mot målorganismene, ikke funnet signifikante forskjeller mellom MON 810 og kontrollinjer med hensyn på sjukdoms- og insektsresistens. I forsøkene er følgende plantesjukdommer registrert: *Exserohium turcicum*, *Bipolaris maydis*, *Erwina stewartii*, *Ustilago maydis* og *Puccinia sorghi*. Forsøk fra 1993-1995 viser ingen genotype x miljø-samspill for de undersøkte karakterene.

Med unntak av resultatene fra spiretestene er det ikke presentert agronomiske data fra noen av feltforsøkene i søknaden. For enkelte av karakterene (agronomisk kvalitet, reproduksjons-egenskaper, sjukdoms- og insektsresistens) henvises det til en publikasjon av Croon et al. (1995). Denne artikkelen har imidlertid ikke vært tilgjengelig. I Monsanto's søknader vedrørende maishybridene MON 863 x MON 810 og MON 88017 x MON 810 er det ikke presentert data over agronomisk ekvivalens for denne eventen. MON 810-søknaden inneholder ingen samlet oversikt over hvilke fenotypiske parametere som er registrert, eller forsøksdesign, antall forsøkssteder og -år. Det er heller ikke beskrevet hva som er benyttet som kontrollmateriale i de aktuelle feltforsøkene. På bakgrunn av foreliggende dokumentasjon er det vanskelig å verifisere konklusjonene med hensyn på agronomisk ekvivalens som presenteres av søker.

Maislinjen har vært kommersielt dyrket i en rekke land siden 1996, og en kan derfor anta at eventuelle uventede pleiotropiske effekter, manifestert gjennom endringer i mottagelighet for sjukdommer og skadedyr, morfologiske og utviklingsmessige endringer eller gjennom endret respons på dyrkingsmessige regimer er blitt identifisert gjennom denne perioden. Ikke-intenderte endringer kan derimot først komme til syne ved spesifikke genotype x miljø-samspill.

## 5. Potensiale for ikke intenderte effekter på fitness relatert til genmodifiseringen

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

Maisfrø stiller store krav til spiretemperatur, har ingen frøkvile og frøplantene er svært sensitive for lave temperaturer. Under våre dyrkingsforhold er det derfor små muligheter for oppspiring og vekst av eventuelle spillfrø. I sørlige områder med milde vintre kan spillfrø overleve og spire påfølgende vekstsesong, men arten er ikke persistent og utvikler 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 (Bodet et al. 1994). Det er ingen stedege eller introduserte viltvoksende arter i den europeiske flora som mais kan hybridisere med (OECD 2003).

Med unntak av resistens mot enkelte arter i ordenen *Lepidoptera*, har ikke maislinjen MON 810 egenskaper som skiller den vesentlig fra konvensjonelle sorter med tilsvarende genetisk bakgrunn. I følge opplysninger fra søker er det er ikke påvist endringer i karakterer knyttet til reproduksjon, sjukdomsresistens, konkurransevne eller toleranse for lave temperaturer i feltforsøk i USA og Europa, eller i kommersiell dyrking over en tiårsperiode. Dette er i liten grad dokumentert i søknaden. Det er imidlertid ikke grunn til å anta at den introduserte egenskapen hos MON 810 og avkomstlinjer medfører endringer som kan resultere i økt risiko for utvikling av ugraspopulasjoner av mais i dyrkingsmiljø eller invasjon av naturlige habitater i forhold til konvensjonelle maissorter.

## 6. Potensiale for genoverføring

En forutsetning for genspredning er tilgjengelige veier for overføring av genetisk materiale, enten via horisontal genoverføring av DNA, eller vertikal genflyt i form av frøspredning og krysspollinering. Eksponering av mikroorganismer for rekombinant-DNA skjer under nedbryting av plantemateriale på dyrket mark og/eller pollen i åkrer og omkringliggende arealer. Rekombinant DNA er også en komponent i en rekke mat- og fôrprodukter som er avledet av plantemateriale fra den transgene sorten. Dette medfører at mikroorganismer i fordøyelseskanalen hos mennesker og dyr kan eksponeres for rekombinant DNA.

Siden mais ikke har viltvoksende populasjoner eller nærstående arter utenfor dyrking i Europa, vil vertikal genoverføring være knyttet til krysspollinering med konvensjonelle og eventuelle økologisk dyrkede sorter. I tillegg vil utilsiktet innblanding av genmodifisert materiale i såvare representere en mulig spredningsvei for transgener mellom ulike dyrkingssystemer. Risiko for pollenspredning fra spillplanter vil være helt marginal under norske dyrkingsbetingelser. Alle varieteter av mais som produseres i Europa er innbyrdes fertile.

## 6.1. 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 den eksponerte bakterien (rev. EFSA 2004b; VKM 2005).

Transgenet innsatt i MON 810 har ingen genetisk informasjon som skulle tilsi at det kan ha horisontale genoverføringsevner. Ut fra dagens vitenskapelig innsikt mht genoverføring og flere års forskning for om mulig å framprovosere tilfeldig overføring av genetisk materiale fra planter til mikroorganismer, dyr eller mennesker gjennom inntak eller eksponering, er det ingenting som tyder på at transgenene i MON 810 skal kunne overføres til andre enn naturens kryssingspartnere dvs. annen dyrket mais i Europa. Det er f.eks 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 DNA (<0.1 %) kunne også spores i blodbanene for en kort periode på maksimum 24 timer, mens M13 DNA ble funnet opptil 24 timer i lever og milt (Schubbert et al. 1994). Ved oralt inntak av genmodifisert soya er det vist at DNA er mer stabilt i tarmen hos personer med utlagt tarm sammenlignet med kontrollgruppen (Netherwood et al. 2004). I kontrollgruppen ble det ikke påvist GM DNA i feces.

Nielsen et al. (2000) og De Vries og Wackernagel (2002) har undersøkt persistens av DNA og opptak av GM DNA i jord. I disse laboratorieforsøkene ble det detektert svært små mengder DNA som var overført fra planter til bakterier. Forutsetningen for at dette kunne skje var sekvenshomologi mellom plantetransgenet og mottagerbakterien.

Med bakgrunn i opprinnelse og karakter/egenskaper av *CryIA(b)*-genet og mangel på seleksjonspress i fordøyelseskanal og/eller miljøet, er sannsynligheten for at horisontal genoverføring vil gi selektive fordeler eller økt fitness på mikroorganismer er svært liten. Det er derfor usannsynlig at gener fra MON 810 vil etableres i genomet til mikroorganismer i miljøet eller i fordøyelseskanal hos mennesker eller dyr (Nielsen 2003). Ut fra tilgjengelig kunnskap er det ikke grunn til å forvente at det vil skje horisontal genoverføring av DNA-materiale fra MON 810 til bakterier i tarmflora eller i miljøet.

## 6.2. Vertikal genoverføring

Det finnes en omfattende litteratur på pollenmigriering og utkryssing i mais, både mellom konvensjonelle sorter, og mellom transgene og konvensjonelle sorter. Betydelige metodiske forskjeller mellom studiene og påvirkning av ulike miljøfaktorer gjør imidlertid sammenligning av forskningsresultater vanskelig. I tillegg til direkte målinger av pollenkonsentrasjon i ulike avstander fra pollenkilden, er det benyttet ulike kvalitative og kvantitative metoder til å estimere faktisk utkryssing (fenotypiske markører, proteinanalyse, molekylære markører, kvantitativ DNA-analyse) (Devos et al. 2005). På bakgrunn av empiriske data har det de seinere årene vært utviklet matematiske modeller for simulering av potensialet for utkryssing under ulike betingelser.

Omfanget av utkryssing mellom sorter vil avhenge av en rekke parametere som avstand, topografi og vegetasjon mellom donor- og mottakerpopulasjonene, i tillegg til relativ størrelse, utforming og orientering av dyrkingsfeltene. Størrelsen på henholdsvis donor- og mottakerfeltet vil ha betydning for mengde konkurrerende pollen og dermed faktisk utkryssing (Ingram 2000; Devos et al. 2005). Tilsvarende vil en buffersone med samme landbruksvekst produsere konkurrerende pollen, i tillegg til å være en fysisk hindring for vindspredd pollen mellom feltene, og redusere innkryssingsrater effektivt.



Graden av utkryssing vil også avhenge av hvordan resipientfeltet er utformet. Forsøk har vist at avlange og grunne dyrkingsfelt gir betydelig høyere utkryssingsfrekvenser sammenlignet med smale og dype felt med samme areal.

Utkryssingsfrekvensene påvirkes også av pollenets vitalitet og levedyktighet, størrelsen på reproduksjonsapparatet (pollenproduksjon og utvikling av hunnblomst), synkronitet mellom pollendonorer og pollenmottaker, samt klimatiske forhold som temperatur, vindstyrke, vindretning og nedbør, (Sanvido et al. 2007). I tillegg må en ta i betraktning tiltenkt bruksområde ved vurdering av graden av utkryssing. Når det gjelder fôrmais høstes normalt hele planten og vegetativt vev som ikke påvirkes av krysspollineringen, vil utgjøre en stor del av avlingen (avhengig av sort og modningsnivå).

Mais er primært en fremmedbefruktende art med vindspredning av pollenet, og under normale forhold er frekvensen av sjølpollinering under 5 prosent (Eastham og Sweet 2002). Pollenspredningen foregår normalt over 5-8 dager, med et variasjonsområde på 2-14 dager. Pollenets levedyktighet varierer imidlertid sterkt med miljøforholdene. Normalt er pollenet spiredyktig i om lag 24 timer, men ved lave temperaturer og høy relativ luftfuktighet er det registrert levedyktig pollen opp til 9 dager etter frigjøring (Emberlin et al. 1999). Under norske forhold kan en derfor forvente at maispollen gjennomsnittlig har lengre levetid enn det som ligger til grunn for de fleste studiene som er gjort av utkryssing i mais.

Som hos andre vindbestøvede arter vil pollenspredningen hos mais følge en leptokurtisk fordeling, der det aller meste av pollenet avsettes i relativ kort avstand fra pollenkilden. Det er registrert pollinering mellom maissorter opp til 800 meter, men pollenkornene hos mais er store og relativt tunge, og de fleste undersøkelser av spredningsmønsteret hos denne arten viser at det aller meste av pollenet (90-98 %) avsettes innen 10 til 30 m fra donorplantene (Halsey et al. 2005; Brookes et al. 2004). Devos et al. (2005) har gjennomgått en rekke forsøksresultater fra ulike studier av genspredning i mais. I undersøkelsene er det benyttet ulike metodikk for å estimere faktisk utkryssing i felt. I tillegg er det inkludert to matematiske modeller som simulerer effekter av dyrkingsavstand på utkryssing (MAPOD, SCIMAC). Oversikten viser at ved isolasjonsavstander på 300 m lå utkryssingsfrekvensene mellom 0 og 0,5 %. Når avstanden mellom donor- og mottagerplanter var henholdsvis 200 og 100 meter var frekvensene henholdsvis 0,3 -1,2 %, og 0-1 %. Ved avstander under 50 meter ble det registrert utkryssingsfrekvenser mellom 0,26 og 1 %.

I en nylig publisert studie har Sanvido et al. (2007) vurdert en rekke undersøkelser av utkryssing i mais, og foreslått relevante kriterier for evaluering av slike studier med hensyn på definere vitenskapelig baserte isolasjonsavstander. Kriteriene for evaluering omfatter både biologiske og fysiske parametere, samt relevante dyrkingsbetingelser. Med utgangspunkt i EUs gjeldende terskelverdi for utilsiktet og teknisk uunngåelig innblanding på 0,9 % i mat og fôr, har gruppen foreslått isolasjonsavstander på 20 og 50 m for henholdsvis fôr- og sukkermais.

I utkast til norsk regelverk for sameksistens er det foreslått et krav om minimum 200 meter avstandsisolering mellom dyrkingsareal med henholdsvis transgen og konvensjonell/økologisk mais.

Faggruppe for genmodifiserte organismer har tidligere uttalt at foreslått dyrkingsavstand på 200 meter gir en tilstrekkelig sikkerhetsmargin, og anser at det er svært liten sannsynlighet for at den prosentvise innblandingen av transgener vil overstige 1 % med dette tiltaket (VKM 2006). Generelt anser faggruppen at det under slike forutsetninger er mer sannsynlig at den prosentvise innblandingen vil være under 0,3 % enn i intervallet 0,3 til 1,0 %. Det understrekes imidlertid at dette avhenger av forhold som dyrkingsfeltenes relative størrelse og utforming, samt eventuelle bufferzoner.

Feltforsøk viser ingen indikasjoner på at karakterer knyttet til overlevelse, reproduksjon og spredning er endret hos MON 810 i forhold til ikke-transgene linjer, med unntak av ved tilstedeværelse av målorganismer. Pollenproduksjon og pollenets levedyktighet forventes ikke å påvirkes av genmodifikasjonen. Det er derfor ikke sannsynlig at utkryssingsfrekvensene til andre sorter vil være forskjellig fra konvensjonelle sorter.

Insektresistens vil ikke representere noen selektiv fordel for spredning av mais i Europa. Overlevelse hos mais er hovedsaklig begrenset av manglende frøkvile, mottakelighet 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.

## 7. Samspill mellom GMP og målorganismer

I Norge er det rapportert om 8 funn av europeisk maispyralide (*Ostrina nubilalis*). Alle påvisningene er gjort i fylkene Vestfold, Telemark, Aust-Agder og Vest-Agder (<http://nhm.uio.no/norlep/>). Det er ikke rapportert om funn av arter av familien nattfly (*Sesamia* spp.) her i landet (<http://nhm.uio.no/norlep/>). Planteklinikken ved Bioforsk har verken mottatt eksemplarer av disse skadegjørerne eller prøver av plantemateriale med skader fra disse (H.M. Sing pers. komm.). Den eneste skadegjøreren som er rapportert på mais i Norge er bladlus. Undersøkelser har imidlertid vist at bladlus ikke påvirkes av CRY1A(b)-proteinet (Bourguet et al. 2002). *Bt*-mais som uttrykker CRY1A(b)-proteinet er også testet mot nattflyarten *Agrostis ipsilon* (stort jordfly) som målorganisme, med liten eller ingen effekt (Pilcher et al. 1997b). Stort jordfly opptre av og til som skadedyr i rotvekster i Norge, og det er mulig at arten også kan gjøre skade i mais.

### **Resistensutvikling**

Utvikling av resistens hos insekter overfor *Bt*-toksin er en viktig problemstilling, med både agronomiske og miljømessige implikasjoner. Konvensjonelle *Bt*-produkter, i form av insekticider som sprayes på plantene, har kort virketid (dager), og behandlingen vil ikke være effektiv overfor alle individene av målorganismene. Til tross for dette har noen arter utviklet resistens etter intensiv bruk av *Bt*-spray. Den første dokumentasjonen på resistens mot *Bt* som sprøytet insekticid ble gjort i populasjoner av kålmøll (*Plutella xylostella*) på Hawaii (Tabashnik et al. 1990). I følge OECDs nylig publiserte konsensudokument vedrørende *Bt*-planter (OECD 2007) er det ikke påvist utvikling av resistens hos målorganismene *O. nubilalis* eller *Sesamia nonagroides* i felt i Europa. Laboratorieforsøk i USA har imidlertid påvist resistensutvikling hos *O. nubilalis* ved eksponering for Dipel®, et insekticid som inneholder *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Li et al. 2005). Når larver fra Dipel®-resistente populasjoner ble føret med CRY1A(b)-proteiner, utviklet de også resistens mot dietten (Li et al. 2005).

Når det gjelder *Bt*-mais vil herbivorer innta toksinet hver gang de konsumerer plantevev, noe som åpenbart har implikasjoner med hensyn på resistensutvikling. Det har vært stor oppmerksomhet med hensyn på tiltak for å hindre rask utvikling av resistens. Vanlig praksis i dag er å sette av refugearaler med ikke-transgen mais i tilknytning til arealene med *Bt*-mais. Dette for å sørge for et habitat der herbivorene ikke eksponeres for toksinet, og kan utvikle populasjoner som ikke nedarver resistensgener. Det anbefales en strategi der 5 % av maisarealene består av usprøytet, ikke-transgen mais som enten plantes i nærheten av arealene med *Bt*-mais, eller inkorporeres i åkrer med transgen mais. Alternativt anbefales et dyrkingsregime der 80 % av arealene består av *Bt*-mais og resterende 20 % med refugearaler med konvensjonell mais som behandles med ikke-*Bt*-insekticider (Shelton et al. 2002). Metodene med dyrking av konvensjonell mais i tilgrensende refuger har vist seg å være mest effektiv til å motvirke resistensutvikling.

I tillegg til utvikling av resistens hos målorganismene, kan polyfage herbivorer utvikle resistens mot CRY1A(b). Dette vil igjen medføre at *Bt*-baserte plantevernmidler ikke kan nyttes i kontroll av disse herbivorene i andre kulturer.

## **8. Samspill mellom GMP og ikke-målorganismer (effekter på predatorer og parasitoider på målorganismene, effekter på andre ikke-målorganismer)**

Uttalelse fra søker mhp risiko i forhold til ikke-målorganismer:

*Målorganismen for Bt-toksinet i MON 810 er planteskadegjøreren maispyralide (Ostrina nubilatis). Krystallproteinene CRY1A(b) er spesifikk toksisk for larver i ordenen Lepidoptera, men er ifølge søker ikke toksisk for andre insektarter, verken direkte eller gjennom sekundær predasjon. Endotoksinet har vært brukt som pesticid i landbruket mot ulike Lepidoptera –arter i stor skala i mange EU-land i om lag 20 år (både i maiskulturer og i skogbruk). Resultater fra analyser av maiskorn og fôr viser at transgene og konvensjonelle planter under tilsvarende dyrkingsbetingelser er ekvivalente med hensyn på sammensetning. Det er ikke identifisert risiko for ikke-målorganismer av herbivorer, inkludert vertebrater som eksponeres for toksinet. CRY1A(b) proteinet, som uttrykkes i transgene planter, er identisk med proteinet i kommersielle, mikrobiologiske insekticider (som brukes trygt i skadedyrbekjempelse).*

### **Artropoder på maisplanter**

Det er gjennomført en rekke studier av effekter av *Bt*-mais på artropoder som ikke-målorganismer. Flertallet av disse studiene støtter søkers vurderinger, mens enkelte laboratorieforsøk viser negative effekter på artropoder (Hilbeck og Schmidt 2006).

MacIntosh et al. (1990) undersøkte spesifisiteten til det aktuelle CRY-proteinet, og fant at bare et begrenset antall lepidoptera-larver ble påvirket. Disse studiene var basert på inntak av rene *Bt*-proteiner. Bourguet et al. (2002) studerte effekten av *Bt*-mais, inkludert MON 810, på forekomst av ikke-målinsekter i felt. I forsøkene med MON 810 ble effekter på bladlus og deres predatorer/parasitoider spesielt studert. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i forekomst av bladlus eller predatorer/parasitoider. I undersøkelsen ble predatorene *Orius insidiosus*, *Syrphus corollae*, *Coccinella septempunctata*, *Chrysoperla carnea* og trips, samt parasitoider av gruppen hymenopterans (snylteveps) registrert.

I et laboratorieforsøk med pollen fra *Bt*-mais som uttrykker CRY1A(b)-protein, ble det ikke påvist effekt på *O. insidiosus*, *C. carnea* eller *Coleomegilla maculata* (Pilcher et al. 1997a). Undersøkelsen ble etterfulgt av et feltforsøk over to år der predatorer av *O. nubilatis* ble overvåket før, under og etter pollenspredning. Forfatterne av undersøkelsen konkluderte med at pollen fra planter av *Bt*-mais ikke påvirker bevegelsene til disse predatorene (Pilcher et al. 1997a).

En annen *Orius*-art, nebbtegen *O. majusculus*, ble undersøkt for potensielle effekter av *Bt*-mais i et laboratorieforsøk (Zwahlen et al. 2000). Predatoren ble føret med trips (*Anaphothrips obscurus*) som hadde vært alt opp på henholdsvis *Bt*-mais og ikke-transgen mais. Selv om trips ikke er sensitiv for *Bt*-toksinet, ble det antatt at toksinet var tilstede i organismen når denne ble konsumert av nebbtegene. Undersøkelsen viste ingen signifikante forskjeller i dødelighet eller utviklingstid for predator.

I et sveitsisk preferanseforsøk fra 2001 ble det benyttet alle tre larvestadier av *C. carnea* (gulløye) og to byttedyr, bladlusen *Rhopalosiphum padi* og sommerfuglen *Spodoptera littoralis*. I denne studien, der det også ble benyttet *Bt*-mais som uttrykte CRY1A(b) (ikke MON 810), ble det ikke påvist letale effekter på noen av byttedyrene. I preferansetestene foretrakk predator larver av *S. littoralis* som var føret med ikke-transgen mais (Meier og Hillbeck 2001). Når det gjelder bladlus ble det ikke funnet noen preferanse avhengig av diett/fôrtype. I valget mellom *S. littoralis* og *R. padi* foretrakk *C. carnea* bladlus. Forfatterne antar at dette kan ha sammenheng med at bladlusene ikke inneholder *Bt*-toksin, siden toksinet ikke er tilstede i plantenes floem. Hvis dette er tilfelle, skulle ikke transgen mais med *Bt*-toksin påvirke *C. carnea*. Laboratoriestudier som viser at bladlus ikke tar opp *Bt*-toksin fra floemet ble publisert av Dutton et al. i 2002. Disse undersøkelsene viste også at når *C. carnea* ble føret med *S. littoralis* fra *Bt*-mais hadde de en økt dødelighet og forsinket utvikling. Dette vil imidlertid være av mindre betydning hvis resultatene fra laboratorieforsøkene der *C. carnea* ikke ser ut til å preferere *S. littoralis* er representativt for forholdene i felt.

Tilsvarende studier er utført for å undersøke effekter av Ichneumonid parasitoiden *Campoletis sonorensis*, der verten *O. nubilalis* ble føret med henholdsvis *Bt*-mais og ikke-transgen mais (Sanders et al. 2007). Resultatene fra denne undersøkelsen viser at hos parasitoider fra verter føret med transgen mais, ble de voksne individene signifikant mindre. Størrelsen på imago var direkte relatert til størrelsen av verten på det tidspunkt eggleggingen skjer, og vertens videre vekstrate. Ved analyse av den nye generasjonen med voksne parasitoider ble det ikke påvist CRY1A(b)-protein. Dette indikerer at størrelsen på de voksne individene utelukkende var knyttet til verten, og ikke en direkte effekt av toksinet på parasitoiden. I undersøkelsen var det også inkludert en preferansetest der parasitoiden kunne velge verter fra henholdsvis *Bt*-mais og ikke-transgen mais. Ingen signifikante forskjeller ble funnet.

I en studie av Romeis et al. (2004) ble CRY1A(b)-toksinet gitt direkte til larver av *C. carnea* i konsentrasjoner på om lag 10.000 ganger mer enn normalt i lepidoptera larver som er føret med *Bt*-mais. Det ble ikke påvist noen effekter av toksinet på gulløyene. Forfatterne relaterer tidligere påvisninger av negative effekter av insektresistent mais til forhold knyttet til selve byttedyret og ikke til *Bt*-toksinet.

I en feltstudie, der MON 810 ble sammenlignet med nær-isogene linjer av mais, fant Daly og Buntin (2005) en reduksjon av antall individer av *Carpophilus* spp. (sap beetles) og *Euxesta stigmatis*. Dette ble tilskrevet mindre skade på kolbene av målorganismen, 'corn earworm' (*Helicoverpa zea*), siden skadede kolber er det som tiltrekker disse insektene til mais. Det ble også registrert en reduksjon i predatorer av *Nabis* ssp. Ifølge forfatterne bak undersøkelsen var imidlertid antallet individer for lavt til at det kan trekkes noen konklusjoner. Det er registrert 8 *Nabis*-arter av i Norge (Coulianos og Ossiannilsson 1976).

Sisterson og Tabashnik (2005) har modellert effekter på spesifikke parasitoider av målorganismen ved dyrking av store arealer med *Bt*-mais. Hypotesen var at en nesten utryddelse av vertsinsektet ville føre til lokal nær utslettelse av den spesialiserte parasitoiden. Undersøkelsen viste at uten vekstskifte eller refugiearealer med konvensjonell mais økte tapet av parasitoider lokalt, relatert til mangel på vertsinsekter. Det er ikke sannsynlig at dyrkingsarealet av mais i Norge vil bli så stort at spesifikke parasitoider på *O. nubilalis* vil utryddes lokalt. Det er også lite trolig at *Bt*-mais vil dyrkes uten arealer med ikke-transgene maislinjer i umiddelbar nærhet (som også er krav fra produsent) eller uten vekstskifte.

### *Artropoder i nærheten av maisplanter*

I Spania, der *Bt*-mais har vært dyrket siden 1998, er det gjennomført en studie av forekomst av artropoder som lever som predatorer på henholdsvis *Bt*-mais og konvensjonell mais (de la Poza et al. 2005). Forsøket ble ikke utført på MON 810, men en annen *Bt*-mais med CRY1A(b). Predatorene ble overvåket visuelt på plantene eller i feller (pitfall traps). Det ble ikke funnet forskjeller i tetthet av *Anthocoridae*, *Coccinellidae*, *Aranea* eller *Carabidae* i *Bt*-mais sammenlignet med konvensjonell mais. Dette er taxa som er vanlig i dyrkingsfelt med mais i Norge.

Ludy og Lang (2006) har også studert effekt av *Bt*-mais som uttrykker CRYA(b)-protein (ikke MON 810) på edderkopper i et 3-årig forsøk i Tyskland. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i antall edderkopper i felt med *Bt*-mais eller tilhørende randsoner, sammenlignet med tilsvarende arealer med konvensjonelle sorter.

Den kanskje mest omfattende og detaljerte undersøkelsen av effekter av *Bt*-mais på ikke-målorganismer av artropoder er utført av Dively (2005). Studien gikk over en 3-års periode i Maryland i USA. Over 500.000 artropoder fra 13 ordener, 112 familier og 203 taksonomiske grupper ble registrert. Maislinjene inneholdt genene *Cry1A(b)* og *Vip3A*, og det er rimelig å anta at mulige negative effekter av CRY1A(b)-toksinet ville kommet fram i denne undersøkelsen. Effekter av *Bt*-mais ble sammenlignet med konvensjonelle maislinjer med og uten behandling med insekticider. Artropodene ble registrert ved visuell inspeksjon og ulike feller (sticky traps, pitfall traps, emerge traps). Det ble også foretatt registrering i påfølgende vekstsesonger for å dokumentere eventuelle 'carry over effekter'. Alle familier av artropoder som en kan forvente opptrer i maisåkrer i Norge er representert i listen over herbivorer, saprofager, predatorer og parasitoider som er påvist i felt med isogene maislinjer. Det ble påvist signifikante forskjeller mellom henholdsvis insekticidbehandlete maisplanter og øvrige behandlinger (*Bt*-mais og ikke-transgen mais). Det konkluderes med at det ikke er signifikante forskjeller i biodiversitet og respons på samfunnsnivå forårsaket av *Bt*-mais. Forskjellene i forekomst av enkelte arter mellom *Bt*-mais og kontrollfelt ble relatert til faktorer som mangel på byttedyr eller mangel på skadete planter. Resultatene av undersøkelsen er i overensstemmelse med konklusjonene fra de andre studiene som er omtalt tidligere.

I Tyskland har Gathmann et al. (2006) evaluert effekter av MON 810 på andre lepidoptera-larver i felt (ikke-målorganismer). Det ble etablert belter med ugrasplanter i plot med henholdsvis MON 810 og ikke-transgen mais, med og uten behandling med insekticider. Naturlig forekommende lepidoptera-larver på ugrasplantene ble registrert. De eneste artene som forekom i tilstrekkelig antall til å behandles statistisk var *Plutella xylostella* og *Pieris rapae*, arter som er knyttet til korsblomstfamilien (*Brassicaceae*). Begge disse artene ble funnet på kvitsennep (*Sinapis alba*). Det ble ikke detektert forskjeller mellom forsøksfelt med MON 810 og felt med ubehandlede, konvensjonelle planter.

Det tyske forsøket ble sannsynligvis initiert på bakgrunn av kontroversen etter Nature-artikkelen der effekter av pollen fra *Bt*-mais på larver av monarksommerfuglen (*Danaus plexippus*) ble rapportert (Losey et al. 1999). Laboratorieforsøket ble etterfulgt av en publikasjon som vurderte effekter av økologiske faktorer i felt og effekter av eksponering av naturlige mengder pollen fra *Bt*-mais på monarksommerfugl (Jesse og Obrycki 2000). Studien viser signifikant økt dødelighet for larver som ble fôret med vertsplanten rosesilkeurt (*Asclepias syriaca*) dekket med transgent maispollen, sammenlignet med planter med pollen fra konvensjonelle sorter. I en seinere publikasjon konkluderer imidlertid forfatterne med at pollen og pollenbærere fra MON 810 ikke har noen målbar effekt på egglegging eller overlevelse hos monarksommerfugl (Jesse og Obrycki 2003).

Undersøkelsene med monarksommerfugl er utført i USA. Lignende studier er seinere gjort ved europeiske laboratorier med sommerfuglarten svaletstjert (*Papilio machaon*) og vertsplanten pastinakk

(*Pastinaca sativa*). Undersøkelsene viste at larver som ble eksponert for ulike tettheter av pollen fra *Bt*-mais (CRY1A(b)) hadde lavere vekt, lengre utviklingstid, dårligere overlevelse, og mindre vinger som voksen (Lang og Vojtech 2006). Disse resultatene ble mer uttalt ved høyere tetthet av pollen. I denne undersøkelsen ble *Bt176* mais benyttet, og en antar at pollen fra MON 810 har betydelig lavere nivå av toksinet. Halvparten av de negative effektene av *Bt*-pollen i de første forsøkene var relatert til ensidig diett, noe som illustrerer viktigheten av utforming av forsøk og kontroller for å avdekke spesifikke effekter av for eksempel CRY1A(b) (Losey et al. 1999).

Honningbier (*Apis mellifera*) er sannsynligvis det mest studerte ikke-målinsektet med hensyn på mulige virkninger av konvensjonelle pesticider. I nyere undersøkelser som er presentert i forbindelse med søknader om godkjenning av *Bt*-sorter er det ikke rapportert om negative effekter verken på larver eller voksne individer ved eksponering for *Bt*-toksin og toksinholdig pollen (inkludert CRY1A(b))(OECD 2007).

I en oversiktsartikkel av Malone og Pham-Delegue (2001) er resultater fra ulike undersøkelser av effekter av *Bt*-planter på honningbier og humler (*Bombus* spp.) diskutert. Resultater så langt tyder på at direkte effekter av transgene planter på pollinerende insekter varierer sterkt avhengig av type transgen og den biologiske aktiviteten til proteinet som uttrykkes. Når det gjelder *Bt*-toksiner som er spesifikke for Lepidoptera-arter konkluderer forfatterne med at det er svært lite sannsynlig at disse vil påvirke bier og humler. Disse konklusjonene underbygges av seinere studier.

Ramirez-Romero et al. (2005) har testet virkningene av CRY1A(b)-protein og to ulike syntetiske insekticider på fôringsaktivitet og læringskapasitet hos honningbier. Det ble ikke påvist effekter av *Bt*-toksinet på dødelighet, næringsinntak og læreevne hos bier som ble fôret med *Bt*-toksin i sirup i konsentrasjoner som var høyere enn det som normalt uttrykkes i pollen fra MON 810. Fôringsaktiviteten ble derimot redusert under og etter behandlingen. For gruppene som ble behandlet med insekticider ble det påvist effekter av behandlingen på alle undersøkte parametere. I en canadisk studie undersøkte Bailey et al. (2005) effekten av CRY1A(b)-toksin og ulike insekticider på honningbier både ved direkte kontakt og ved inntak. I denne undersøkelsen ble det ikke funnet effekter av *Bt*-toksinet på dødeligheten av biene.

### **Røddlistede arter**

Norsk Rødliste (Kålås et al. 2006) omfatter 11 arter av Lepidoptera, som finnes i jordbrukslandskap og som påvirkes av kjemikalier i miljøet. Dette gjelder artene *Epirrhoe pupillata*, *Digitivalva arnicella*, *Scythris disparella*, *Brachmia dimidiella*, *Zygaena osterodensis*, *Zygaena lonicerae*, *Eupoecilia sanguisorbana*, *Cochylis atricapitana*, *Endothenia oblongana*, *Eucosma scorzonera* og *Dichrorampha consortana*. Ingen av disse artene lever på mais som larve. De fleste av artene er røddlistet på grunn av smalt vertspekter, samt at vertsplantenes habitater er redusert eller i ferd med å forsvinne.

Når det gjelder storskaladyrking av MON 810 i andre regioner i Europa kjenner faggruppen ikke til forsøk som har studert hvilken effekt dyrking av MON 810 kan ha på røddlistede Lepidoptera-arter.

### **Konklusjoner**

Den eneste målorganismen for *Bt*-toksinet i MON 810 som er registrert i Norge er maispyralide *Ostrinia nubilalis*. *O. nubilalis* er imidlertid ikke rapportert som skadegjører i Norge, og det ingen godkjente insekticider til bruk mot denne skadegjøreren.

Hvis maislinjen MON 810 blir godkjent for dyrking i Norge, synes risiko for ikke-mållartropoder å være ubetydelig. Majoriteten av studier på ikke-målorganismer av artropoder har vist liten eller ingen effekt av CRY1A(b)-proteinet. Når det gjelder arter av ikke-målorganismer som det er knyttet usikkerhet til, vil arealet med *Bt*-mais i Norge være så lite at det er svært usannsynlig at det vil medføre noen trussel for disse organismene. Dette gjelder selv om hele dyrkingsarealet med mais skulle bestå av MON 810.

Potensialet for utvikling av resistens mot CRY1A(b) er en svært kompleks problemstilling. På den ene siden vil de svært begrensede maisarealene i Norge i seg selv være velegnet til å motvirke resistens i tråd med anbefalt dyrkingspraksis. På den andre siden er populasjonene av *O. nubilalis* for nærværende små og isolerte. Hvis det skulle utvikles resistens i en region vil det derfor være en svært begrenset ikke-resistent populasjon av mållinsektet tilstede til 'å tynne ut' resistensallelene i genpoolen.

## 9. Potensial for samspill med abiotisk miljø og eventuelle effekter på biogeokjemiske prosesser

Som en konsekvens av dyrking av insektresistent mais vil *Bt*-toksiner inkorporeres i jord, og jordlevende organismer kan eksponeres for disse toksinene både gjennom plantemateriale, pollen og ved at planterøttene frigir toksin til jordvæske (roteksudater) (Saxena et al., 2002). Problematikken rundt mulig persistens og akkumulering i jord har vært diskutert i en rekke studier. Dette gjelder både direkte og indirekte virkninger av toksinet eller *Bt*-maisene på ikke-målorganismer og jordmiljø i form av bl.a. potensiell økning av lignininnholdet i kombinasjon med en mulig redusert nedbrytningshastighet.

Tilsendt materiale vedrørende MON 810 inneholder lite dokumentasjon vedrørende maisens potensielle effekter på jordlevende organismer, men en 4-ukers reproduksjonstest med spretthaler (*Folsomia candida*) viser ingen effekter ved føring med opptil 50 % frysetørret MON 810-mais iblandet tørrgjær. I tillegg er det inkludert en 14-dagers test med meitemark (*Eisenia fetida*) som ikke viser effekter på overlevelse ved eksponering for en konsentrasjon av CRY1A(b)-proteinet på 200 mg/kg jord

I litteraturen finnes imidlertid mange studier av mais som uttrykker *Bt*-toksinet og dens skjebne og effekter i jordmiljøet. Det finnes en lang rekke laboratoriestudier og omfattende feltstudier som viser fravær av effekter av *Bt*-toksiner på nedbrytningsprosesser, mikrobiell samfunnsstruktur og et bredt spekter av jordlevende organismer under relevante eksponeringsbetingelser (Sims og Martin 1997; Escher et al., 2000; Glare og O'Callaghan, 2000; Saxena og Stotzky, 2001; Koskella og Stotzky, 2002; Griffiths et al., 2005; Cortet et al., 2006; Vercesi et al., 2006).

Det er vist at *Bt*-toksin initielt brytes relativt raskt ned i jord, men at mindre restmengder kan forbli i jorden i flere år (Vettori et al., 2003; Hopkins og Gregorich, 2003), noe som indikerer potensial for langtidseksponering av jordlevende organismer. Vettori et al. (2003) viste i sine undersøkelser med konvensjonelle insekticider at *Bt*-toksiner i form av krystaller er persistent i jord i minst 28 måneder. Zwahlen et al. (2003a) har publisert resultater fra to sveitsiske feltstudier der nedbryting av CRY1A(b)-toksin fra blad av *Bt11*-mais ble registrert gjennom høst, vinter og vår i en periode på 200 dager. Ved slutten av forsøksperioden var 0,3 % av det opprinnelige proteinet fortsatt til stede i jorda. En annen studie med ulike maislinjer fra MON 810 og *Bt11* viste at omfanget av lignifisering av *Bt*-mais ikke er forskjellig fra kontrollinjer (Jung og Scheaffer 2004).

I et laboratorieforsøk av Flores et al. (2005) ble nedbryting av ulike arter som uttrykte *Bt*-toksiner analysert, og resultatene diskutert i relasjon til lignininnhold og potensielle miljømessige konsekvenser. Generelt hadde planterester av nær-isogene linjer av konvensjonell mais høyere CO<sub>2</sub>-produksjon sammenlignet med *Bt*-mais, effekter som ikke kunne relateres til forskjeller i C/N-forhold, lignininnhold eller mikrobiell aktivitet. Som et ledd i EU-prosjektet ECOGEN har Cortet et al. (2006) undersøkt effekter av CRY1A(b)-protein på nedbryting av hvetehalm i felt på 3 klimatiske ulike lokaliteter i Europa (Danmark og Frankrike). I undersøkelsen ble *Bt*-mais og konvensjonelle, nær-isogene linjer dyrket på 3 ulike jordarter og i tråd med vanlig dyrkingspraksis. Resultater etter 4 måneder viste at nedbryting og mineralisering av organisk materiale primært var knyttet til effekter av klimaforhold. Det ble ikke påvist effekter av *Bt*-toksinet.

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

Spretthaler (*Collembola*) er vanlig i jordbruksjord, og har betydning for nedbryting av organisk materiale. I studier av effekter av MON 810 på spretthalearten *Folsomia candida* føret Clark og Coats (2006) spretthalene med oppmalt bladmateriale av mais. Forskjeller i vekst hos ikke-målorganismene ble relatert til forskjeller i næringsinnhold i de to sortene som ble benyttet i forsøket, og ikke til selve *Bt*-toksinet. Disse resultatene er i overensstemmelse med konklusjonene fra ECOGEN-prosjektet (Cortet et al. 2007). Studien ble utført på 4 lokaliteter, 2 i Frankrike og 2 i Danmark. Forsøksstedene i Danmark er klimatiske sammenlignbare med aktuelle dyrkingsområder for mais i Norge. Undersøkelsen viser at de minimale forskjellene i forekomst av små jordlevende artropoder som er påvist mest sannsynlig hadde sammenheng med maissort og ikke *Bt*-toksinet i seg selv. Heckmann et al. (2006) fant forskjeller i atferd/opptreden hos spretthaler når de ble føret med gjær i forhold til mais, men ingen forskjeller mellom *Bt*-mais og ikke-transgen mais.

I nevnte ECOGEN-prosjekt har Griffiths og kolleger undersøkt effekter av ulike jordarter ved dyrking av MON 810 og ikke-transgen mais i veksthus (Griffiths et al. 2006). Forsøkene inkluderte behandling med et pyretroid insektmiddelet (deltamethrin), som økte konsentrasjonen av *Bt*-toksin i MON 810. Årsakene til dette er uklare. Forsøkene evaluerte effekter på to grupper av små artropoder, nemlig spretthaler og midd, ved ekstraksjon fra jordprøver på ulike vekststadier hos maisplantene. For å undersøke effekter på store artropoder ble kålrot (*Brassica napus* ssp. *rapifera*) dyrket i jord fra maissfelt og inokulert med egg fra liten kålflue (*Delia radicum*). Det ble ikke funnet signifikante effekter av jord fra MON 810 for noen av gruppene med artropoder.

Det finnes enkeltstudier som viser små, men signifikante effekter av *Bt*-toksin. En langtidsstudie av Zwahlen et al. (2003b) viste redusert vekst (18 %) av meitemark (*Lumbricus terrestris*) i en 200 dagers laboratoriestudie. Det ble ikke funnet forskjeller i dødelighet mellom gruppene som ble behandlet med henholdsvis *Bt*-mais og konvensjonell mais. Det var imidlertid ikke mulig å si om vektforskjellene var relatert til toksinet eller andre faktorer. Blackwood og Buyer (2004) viste mindre effekter på jordmikrobiell samfunnsstruktur i en leirjord.

Douville et al. (2005) har undersøkt nivå av CRY1A(b)-toksin i akvatiske miljø i Canada. I undersøkelsen ble det tatt prøver av overflatevann, jord og sedimenter fra vassdrag med avrenning fra dyrkingsarealer med henholdsvis *Bt*-mais og konvensjonelle maissorter som ble sprøytet med insekticider. Resultatene viste at nedbrytingen av endotoksinet gikk raskere i vann enn i jord (halveringstid 4 og 9 dager), mens for krystaller fra pesticidene var nedbrytingstiden lenger. Nivået av



CRY1A(b)-proteinet i prøver fra sedimenter og overflatevann varierte fra 0,1 til 1 ng/g eller ng/ml. I flertallet av prøvene var imidlertid toksin-nivået under deteksjonsgrensen.

I en oppfølgingsstudie fra 2007 undersøkte Douville et al. forekomst og persistens av *CryIA(b)*-genet i vassdrag i nærheten av dyrkingsfelt med *Bt*-mais. Resultatene av undersøkelsen viste at genet var persistent i 21 og 40 dager i henholdsvis overflatevann og i sedimenter, og med høyest konsentrasjon i sedimentprøver. Transgenet ble detektert i avstander opp til 82 km fra dyrkingsfeltene.

### **Konklusjon**

Basert på de oppgitte egenskaper til MON 810, vedlagt dokumentasjon, samt informasjon i det meste av åpen litteratur har det ikke blitt funnet signifikante effekter av MON 810 på jordlevende organismer. Ved anbefalt dyrkingspraksis med vekstskifte vil potensielle effekter på jordlevende organismer og jordmiljø trolig være ubetydelige. Det finnes derimot enkeltstudier som viser små, men signifikante effekter av *Bt*-toksin på jordlevende organismer. Det er også kunnskapsmangler med hensyn på effekter av toksinet på vannlevende organismer.

## **10. Miljøovervåkingsplan**

Søknad fra 1996 under direktiv 90/220/EF inneholder ingen miljøovervåkingsplan.

## **KONKLUSJON**

Maislinjen MON 810 inneholder det bakterielle genet *CryIA(b)*, som koder for et  $\delta$ -endotoksin som gir resistens mot enkelte skadeinsekter i ordenen *Lepidoptera*. MON 810 skal, ifølge søknad fra Monsanto, ikke inneholde andre transgener fra opprinnelige genkonstruksjonen enn deler av 35S promoter, *ZmHsp70* og 2.8 kb av 3' enden av *CryIA(b)* genet, nok til å gi et funksjonelt genprodukt som gjør MON 810 motstandsdyktig mot målorganismene maispyralide og enkelte arter av familien nattfly. Faggruppen vurderer det som sannsynlig at funksjonelle, hele antibiotikaresistensgener ikke finnes i MON 810. 35S sekvensen er tilstede i store mengder i norsk natur allerede, og *Hsp70* er et gen som finnes i all mais. Det eneste nye DNA-bidraget fra MON 810 er *CryIA(b)*.

Med unntak for den introduserte egenskapen er ikke MON 810 forskjellig fra konvensjonelle maislinjer med hensyn på karakterer knyttet til overlevelse, reproduksjon og spredning. Det vurderes ikke å være økt risiko for utvikling av ugraspopulasjoner av mais i dyrkingsmiljø eller spredning og etablering utenfor dyrking sammenlignet med konvensjonelle sorter. Det er ingen viltvoksende arter i den europeiske flora som mais kan hybridisere med, og vertikal genoverføring vil være knyttet til krysspollinering med konvensjonelle og eventuelle økologiske sorter. I tillegg vil utilsiktet innblanding av genmodifisert materiale i såvare representere en mulig spredningsvei for transgener mellom ulike dyrkingssystemer.

Ved en eventuell dyrking av MON 810 i Norge vurderes risiko for ikke-målartropoder som lever på eller i nærheten av maisplanter å være ubetydelig. Noen laboratoriestudier viser negative effekter av CRY1A(b)-toksinet på ikke-målorganismer. Arealene med mais i Norge er imidlertid så små at det er lite sannsynlig at dette vil medføre noen trussel for disse organismene. Risiko for negative effekter på jordlevende organismer vurderes til å være minimal. Det er kunnskapsmangler med hensyn på effekter av toksinet på vannlevende organismer.

Det er noe usikkerhet knyttet til potensielle for utvikling av resistens hos målorganismene under norske dyrkingsbetingelser. Når det gjelder storskaladyrking av MON 810 i andre regioner i Europa, kjenner faggruppen ikke til forsøk som viser hvilken effekt dyrking av MON 810 kan ha på rødlistede Lepidoptera-arter.

Målorganismene for denne transformasjonen er ikke rapportert som skadegjørere i norsk landbruksproduksjon, og det vil derfor ikke være noen nytteverdi av å introdusere plantesorter med resistens mot CRY1A(b) under våre dyrkingsforhold.

### Hovedkonklusjon

Det er kunnskapsmangler relatert til effekter av *Bt*-toksinet på ikke-målgrupper av terrestriske og akvatiske organismer. I norsk sammenheng, og sett i forhold til annen mais, finner likevel faggruppen at maislinjen MON 810 har en lav risiko for effekter på miljøet.

## VURDERT AV

### Faggruppe for genmodifiserte organismer:

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

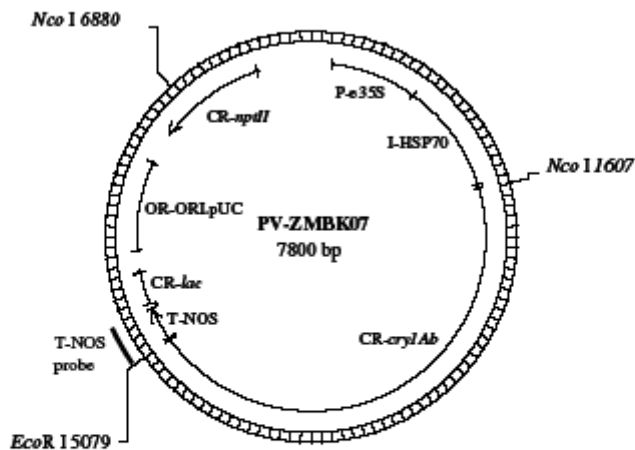
Koordinatorer i sekretariatet: Arne Mikalsen og Elin Thingnæs

## TAKK TIL

Faggruppen takker Merethe Aasmo Finne og Hilde-Gunn O. Sorteberg for utarbeiding av utkast til vurderingen, og Ingeborg Klingen og Dag O. Hessen for innspill.

## TILLEGGSINFORMASJON

Vår Fig. 1



**Figure 1. Schematic Representation of Plasmid PV-ZMBK07**

Restriction map of the plasmid used to transform MON 810. The *Nco* I and *Eco*R I restriction sites are shown. The ~1.8 kb fragment detected by probing with the T-NOS probe is marked.

Vår Fig. 2

Opprinnelig beskrivelse av transgen innsatt på MON 810:

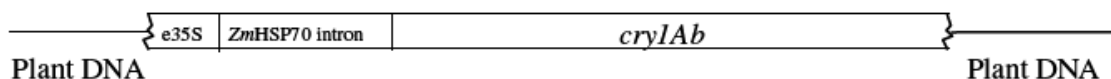
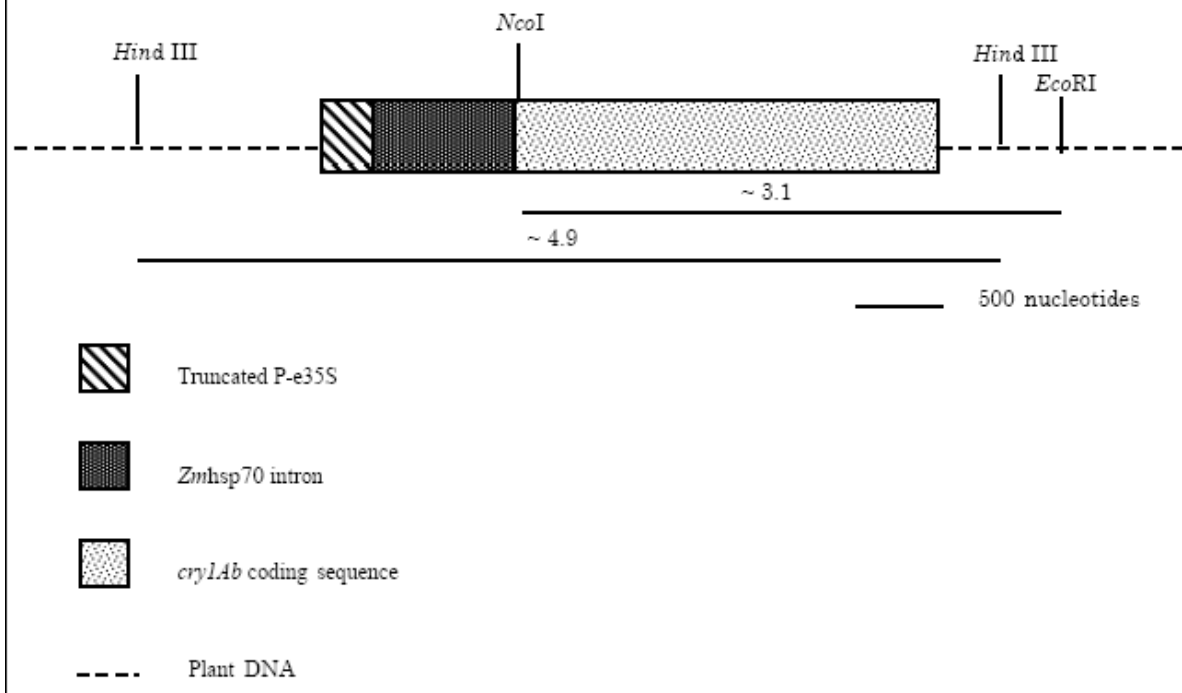


Fig. 1: Rekombinant lineært DNA fragment i genomet til maisen MON 810. Det rekombinante DNA fragment er på 3582 basepar og stammer fra plasmidet PV-ZMBK07. Det rekombinante DNA fragmentet i planten inneholder ikke *nptII* antibiotikaresistensgenet.

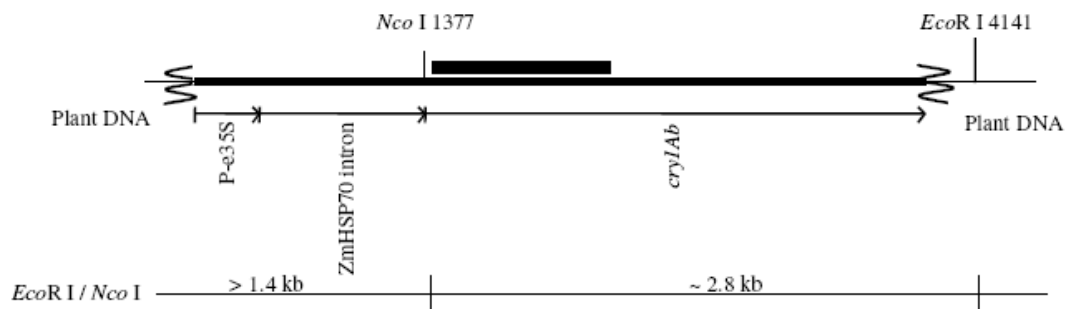
Vår Fig. 3

Figure 2. Schematic representation of the MON 810 insert



Vår Fig. 4:

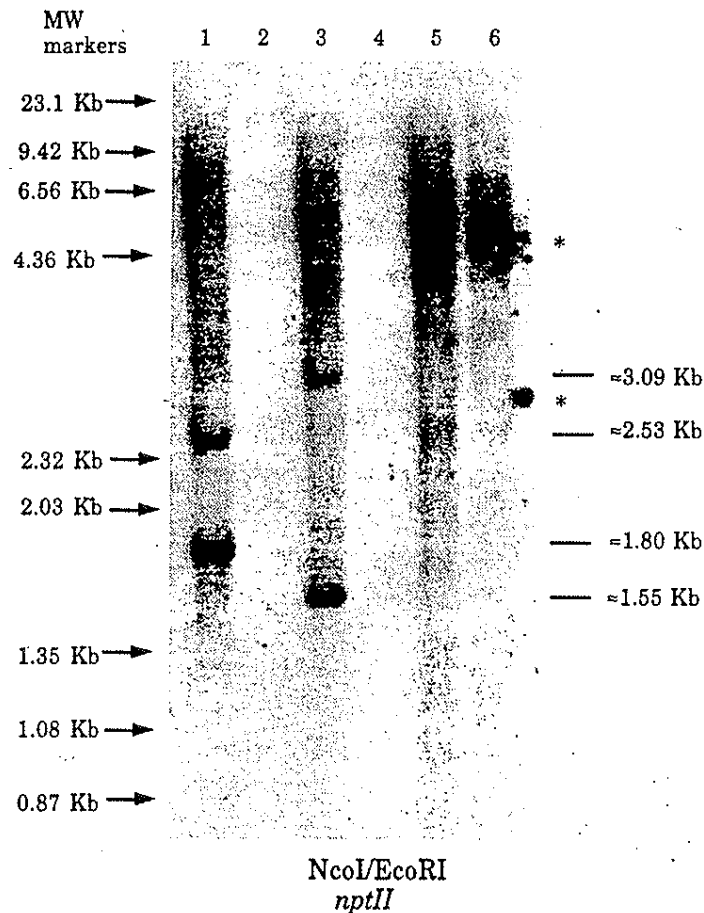
Figure 1 : MON 810 insert



**Figure 1:** The MON 810 insert is illustrated with adjacent genomic DNA sequences flanking the 5' and 3' ends of the insert. The approximate positions of the *Nco* I and *Eco*R I restriction sites are shown as well as the approximate sizes of the resulting restriction fragments. Arrows indicate the direction of transcription. The heavy bar above the diagram represents the probe used to examine the *cryIAb* coding region. Based on the positions of the restriction sites, the probe encompasses the 5' end of the *cryIAb* coding regions from base pair positions ~1155-2066.

Vår Fig. 5

**Figure 5. Southern blot analysis of maize line MON 810 DNA: *nptII/ori-pUC* analysis**

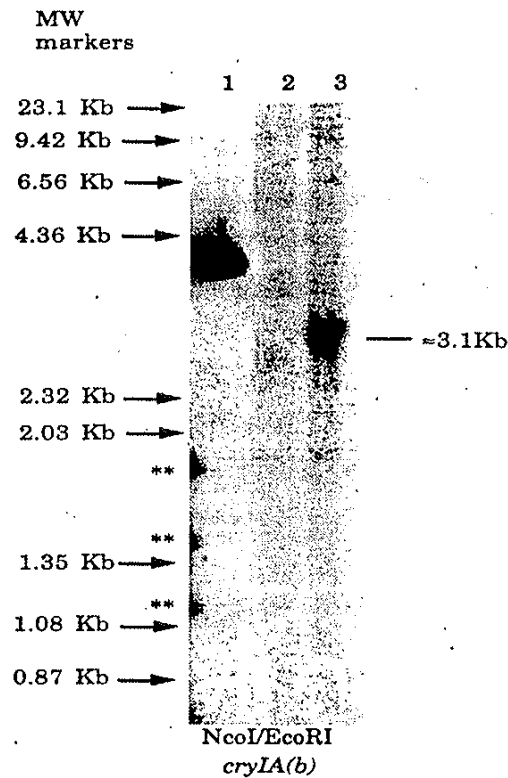


**Figure 5. Southern blot analysis of maize line MON 810 DNA.** Lanes 2 and 4 are empty. Lanes 1, 3, 5 and 6 contain the following DNAs digested with NcoI/EcoRI and probed with *nptII/ori-pUC*: lane 1, MON 818 DNA with ≈50 pg of PV-ZMBK07; lane 3, MON 818 DNA with ≈50 pg of PV-ZMGT10; lane 5, MON 818 DNA; lane 6, MON 810 DNA.

- Symbol denotes sizes obtained from MW markers on ethidium stained gel.
- Symbol denotes sizes obtained from plasmid digests.
- ≈ Symbol denotes a band size approximated from MW markers and plasmid digests.
- \* Symbol denotes an area of nonspecific hybridization.

Vår Fig. 6

**Figure 3. Southern blot analysis of maize line MON 810 DNA: *cryIA(b)* gene analysis**

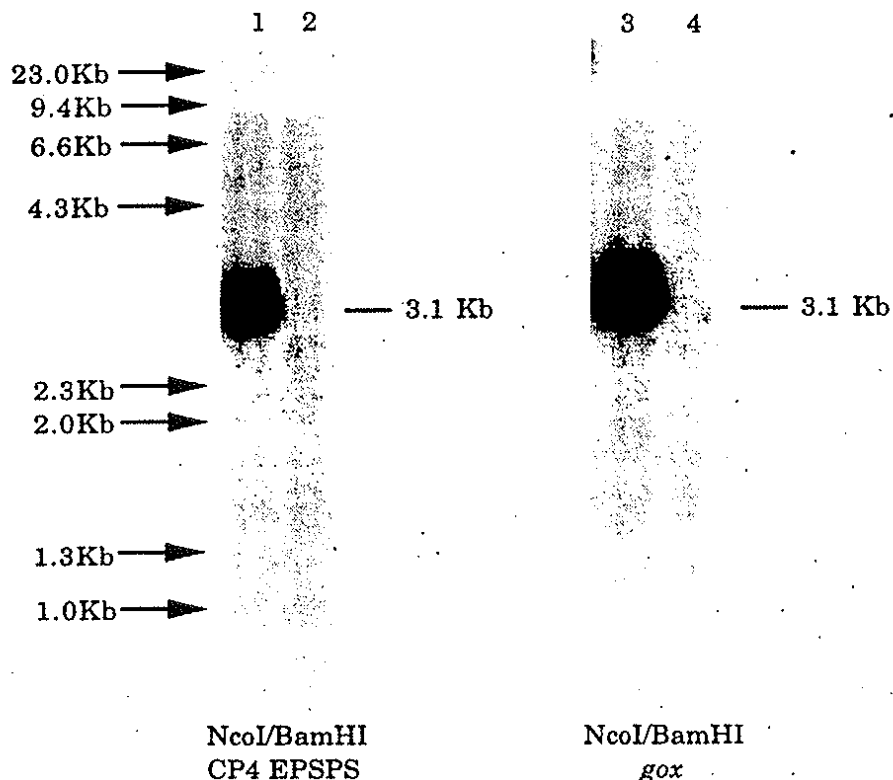


**Figure 3. Southern blot analysis of maize line MON 810 DNA.** Lanes 1-3 contain the following DNAs digested with NcoI/EcoRI and probed with the *cryIA(b)* gene: lane 1, ≈50 pg of plasmid PV-ZMBK07; lane 2, MON 818 DNA, lane 3, MON 810 DNA.

- Symbol denotes sizes obtained from MW markers on ethidium stained gel.
- Symbol denotes sizes obtained from plasmid digests.
- ≈ Symbol denotes a band size approximated from MW marker and plasmid digests.
- \*\* Symbol denotes an area of hybridization in an adjacent lane which only appears to be in lane 1, due to the contents of the lanes migrating at an angle in this portion of the gel.

Vår Fig. 7

**Figure 4. Southern blot analysis of maize line MON 810 DNA: CP4 EPSPS and *gox* gene analysis**



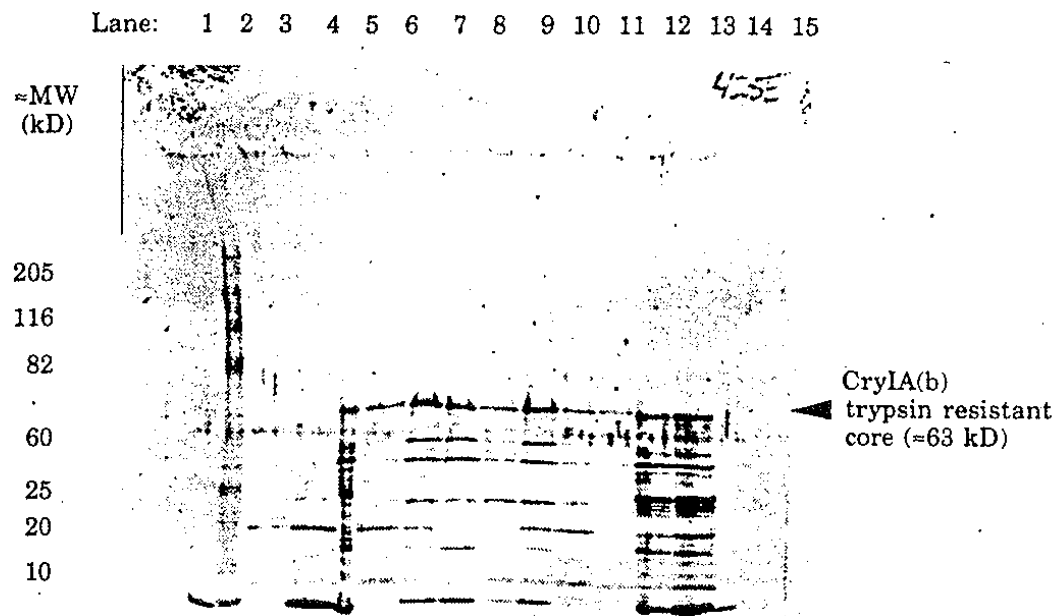
**Figure 4. Southern blot analysis of maize line MON 810 DNA.** Lanes 1-4 contain the following DNAs digested with NcoI/BamHI: lanes 1 and 3,  $\approx 50\text{pg}$  of plasmids PV-ZMGT10 and PV-ZMBK07; lanes 2 and 4, MON 810 DNA. Lanes 1 and 2 were hybridized with the CP4 EPSPS gene. Lanes 3 and 4 were hybridized with the *gox* gene.

- ▶ Symbol denotes sizes obtained from MW markers on ethidium stained gel.  
 — Symbol denotes sizes obtained from plasmid digests.





Vår Fig. 9

**Figure 2. Western blot analysis of trypsinized CryIA(b) proteins in corn tissue extracts.**

Lane	Description
1	Blank lane, 1X SeptraSol
2	Color molecular weight markers from Sigma
3	MON 818 leaf protein extract, trypsinized
4	MON 819 leaf protein extract, trypsinized
5	<i>E. coli</i> -produced CryIA(b) trypsin-resistant core protein standard, ≈20 ng
6	MON 801 leaf protein extract, trypsinized
7	MON 802 leaf protein extract, trypsinized
8	MON 805 leaf protein extract, trypsinized
9	MON 809 leaf protein extract, trypsinized
10	MON 810 leaf protein extract, trypsinized
11	MON 813 leaf protein extract, trypsinized
12	MON 814 leaf protein extract, trypsinized
13	<i>E. coli</i> -produced CryIA(b) trypsin-resistant core protein standard, ≈20 ng, spiked into MON 818 extract
14	<i>E. coli</i> -produced CryIA(b) trypsin-resistant core protein standard, ≈20 ng, spiked into MON 819 extract
15	Blank lane, 1X SeptraSol

- Protein load not determined for the corn extracts
- ≈7.5 µl of each corn extract was loaded in ≈15 µl total volume (lanes 3-4, 6-12)
- When spiked with standards (lanes 13-14), ≈5 µl of the control corn line extracts (MON 818 and MON 819) were loaded in ≈10 µl total volume

**REFERANSER**

- Bailey, J., Scott-Dupree, C., Harris, R., Tolman, J. & Harris, B. 2005. Contact and oral toxicity to honey bees (*Apis mellifera*) of agents registered for use for sweet corn insect control in Ontario, Canada. *Apidologie* 36: 623-633.
- Bakken AK, Nesheim L, Harbo O, Johansen A & Wikmark T (2005) Potensial for dyrking av fôrmais i Norge. *Grønn kunnskap* 9 (106):1-6.
- Barry G, Kishore G, Padgett S, Taylor M, Kolacz K, Weldon M, Re D, Eichholtz D, Fincher K & Hallas L (1992) Inhibitors of amino acid biosynthesis: strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants. In *Biosynthesis and molecular regulation of amino acids in plants*. Singh et al. (eds.) American Society of Plant Physiologists. pp 139-145.
- Barry GF, Taylor ML, Padgett SR, Kolacz KH, Hallas LE, della-Cioppa G & Kishore GM (1994) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the Glyphosate-to-Aminomethylphosphonic acid degradation activity from *Achromobacter* sp. strain LBAA. Report number MSL-13245, an unpublished technical report by Monsanto Company.
- Beck E, Ludvig G, Auerswald EA, Reiss B & Schaller H (1982) Nucleotide sequence and exact localization of the neomycinophotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 19:327-336
- Blackwood CB & Buyer JS (2004) Soil microbial communities associated with Bt and non-Bt corn in three soils. *Journal of Environmental Quality* 33:832-836.
- Borovkov IG, Jennings JC & Lirette RP (2001) Amended report for MSL16776: Confirmation of the genomic DNA sequence flanking the 5' and 3' ends of the insert in YieldGard corn event MON 810. Monsanto Technical Report MSL 17074.
- Bourguet D, Chaufaux J, Micoud A, Delos M, Nabio B, Bombarde F, Marque G, Eychenne N & Pagliari C (2002) *Ostrinia nubilalis* parasitism and the field abundance of nontarget insects in transgenic *Bacillus thuringiensis* corn (*Zea mays*). *Environmental Biosafety Research* 1: 49-60.
- Brookes G, Barfoot P, Mele E, Messeguer J, Benetrix D, Foueillassar X, Fabie A & Poeydomenge C (2004) Genetically Modified Maize: Pollen movement and crop coexistence PG Economics.
- Christou P, Tameria LF & Kofron M (1991) Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *BIO/TECHNOLOGY* 9: 957-962.
- Clark BW & Coats JR (2006) Subacute effects of Cry1Ab Bt corn litter on the earthworm *Eisenia fetida* and the springtail *Folsomia candida*. *Environmental Entomology* 35: 1121-1129.

- Cortet J, Andersen MN, Caul S, Griffiths B, Joffre R, Lacroix B, Sausse C, Thomson J & Krogh PH (2006). Decomposition processes under *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) maize: Results of a multi-site experiment. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 195-199.
- Cortet J, Griffiths BS, Bohanec M, Demsard D, Andersen MN, Caulc A, Birch NE, Pernin C, Tabone E, Vaufloury A, de Keh X. & Krogh PH (2007). Evaluation of effects of transgenic Bt maize on microarthropods in a European multi-site experiment. *Pedobiologia* doi:10.1016/j.pedobi.2007.04.001: (In press).
- Coulianos, C.-C. & Ossiannilsson, F. 1976. *Catalogus Insectorum Sueciae VII. Hemiptera-Heteroptera*. 2nd ed. 97:135-173.
- Daly T & Buntin GD (2005) Effect of *Bacillus thuringiensis* transgenic corn for lepidopteran control on nontarget arthropods. *Environmental Entomology* 34:1292-1301.
- de la Poza M, Pons X, Farinos GP, Lopez C, Ortego F, Eizaguirre M, Castanera P & Albajes R (2005) Impact of farm-scale Bt maize on abundance of predatory arthropods in Spain. *Crop Protection* 24:677-684.
- Devos Y, Reheul D & De Schrijver A (2005) The co-existence between transgenic and non-transgenic maize in the European Union: a focus on pollen flow and cross-fertilization. *Environ. Biosafety Res.* 4:71-87.
- de Vries J & Wackernagel W. (2002) Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* ;99(4):2094-2099.
- Dively GP (2005) Impact of transgenic VIP3A x Cry1A(b) lepidopteran-resistant field corn on the nontarget arthropod community. *Environmental Entomology* 34:1267-1291.
- Douville M, Gagne F, Masson L, McKay, J & Blaise C (2005) Tracking the source of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab endotoxin in the environment. *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 219-232.
- Douville M, Gagne F, Blaise C & André, C (2007) Occurrence and persistence of *Bacillus thuringiensis* Bt corn *cry1Ab* gene from an aquatic environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66: 195-203.
- Dutton A, Klein H, Romeis J & Bigler F (2002) Uptake of Bt-toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for the predator *Chrysoperla carnea*. *Ecological Entomology* 27:441-447.
- Eastham K & Sweet J (2002) Genetically modified organisms (GMO): The significance of gene flow through pollen transfer. Environmental issue report. No 28. European Environment Agency (EEA), Copenhagen. [http://reports.eea.eu.int/environmental\\_issue\\_report\\_2002\\_28/en](http://reports.eea.eu.int/environmental_issue_report_2002_28/en)

- EFSA (2004a) Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the Austrian invoke of Article 23 of Directive 2001/18/EC. The EFSA Journal 78: 1-13.  
[http://www.efsa.eu.int/science/gmo/gmo\\_opinions/507/opinion\\_gmo\\_safeguard\\_clauses\\_austria\\_en1.pdf](http://www.efsa.eu.int/science/gmo/gmo_opinions/507/opinion_gmo_safeguard_clauses_austria_en1.pdf)
- EFSA (2004b) 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](http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_opinions/384.html)
- EFSA (2005) Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the safeguard clause invoked by Hungary according to Article 23 of Directive 2001/18/EC. The EFSA Journal 228: 1-14.  
[http://www.efsa.eu.int/science/gmo/gmo\\_opinions/1046/gmo\\_opinion\\_ej228\\_safeguards\\_en1.pdf](http://www.efsa.eu.int/science/gmo/gmo_opinions/1046/gmo_opinion_ej228_safeguards_en1.pdf)
- 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](http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_guidance/660.html)
- Emberlin J, Adams-Groom B & Tidmarsh J (1999) The dispersal of maize (*Zea mays*) pollen. A report commissioned by the Soil Association: A National Pollen Research Unit, University College Worcester, UK.
- Escher N, Käch B & Nentwig W (2000) Decomposition of transgenic *Bacillus thuringiensis* maize by microorganisms and woodlice *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). Basic and Applied Ecology 1: 161–169.
- Feil B & Schmid JE (2002) Dispersal of maize, wheat and rye pollen: A contribution to determining the necessary isolation distances for the cultivation of transgenic crops. Aachen: Shaker. 66s.
- Fischhoff DA, Bowditch KS, Perlak FJ, Marrone PG, McCormick SM, Niedermeyer JG, Dean DA, Kusano-Kretzmer K, Mayer EJ, Rochester DE, Roger SG & Fraley RT (1987) Insect tolerant transgenic tomato plants. Biotechnology 5:807-813.
- Flores S, Saxena D & Stotzky G (2005) Transgenic *Bt*-plants decompose less in soil than non-*Bt* plants. Soil Biology & Biochemistry 37:1073-1082.
- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Finl CL, Fry JS, Galluppi GR, Goldberg SB, Hoffmann NL & Woo SC (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. PNAS 80:4801-4807.

- Gathmann A, Wirooks L, Hothorn LA, Bartsch D & Schuphan I (2006) Impact of Bt maize pollen (MON 810) on lepidopteran larvae living on accompanying weeds. *Molecular Ecology* 15: 2677-2685.
- Glare TR & O'Callaghan (2000) *Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety*. Wiley and Sons, Chichester. 350 p.
- Griffiths BS, Caul S, Thompson J, Birch N, Scrimgeour C, Andersen MN, Cortet J, Messéan A, Sausse C, Lacroix B & Krogh PH (2005) Microbial community structure, protozoa and nematodes in soil from field plots of genetically modified maize expressing the *Bacillus thuringiensis* toxin. *Plant and Soil* 275:135-146.
- Griffiths B S, Caul S, Thompson J, Birch ANE, Scrimgeour C, Cortet J, Foggo A, Hackett CA & Krogh PH (2006) Soil microbial and faunal community responses to Bt maize and insecticide in two soils. *Journal of Environmental Quality* 35:734-741.
- Hallas LE, Hahn EM & Korndorfer C (1988) Characterization of microbial traits associated with Glyphosate biodegradation in industrial activated sludge. *J Industrial Microbiol* 3:377-385.
- Hallauer AR (2000) Potential for outcrossing and weediness of genetically modified insect protected corn. APHIS-USDA.
- Halsey ME, Remund KM, Davis CA, Qualls M, Eppard PJ & Berberich S (2005) Isolation of Maize from Pollen-Mediated gene Flow by Time and Distance *Crop Science* 45: 2172-2185.
- Harrison LA, Bailey MR, Leimgruber RM, Smith SE, Nida DL, Taylor ML, Gustafson M, Heeren B & Padgett SR (1993a). Characterization of microbially-expressed protein: CP4 EPSPS. Study number 92-01-30-14, MSL-12901. An unpublished study conducted by the Monsanto company. EPA MRID no 43643301.
- Heckmann LH, Griffiths BS, Caul S, Thompson J, Pusztai-Carey M, Moar WJ, Andersen MN & Krogh PH (2006) Consequences for *Protaphorura armata* (Collembola : Onychiuridae) following exposure to genetically modified *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize and non-Bt maize. *Environmental Pollution* 142:212-216.
- Hernández M, Pla M, Esteve T, Prat S, Puigdomènech P & Ferrando A (2003) A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON 810 in maize YieldGard® based on the 3'-transgene integration sequence. *Transgenic Research* 12:179-189.
- Hilbeck A & Schmidt J E U (2006) Another view on Bt proteins – How specific are they and what else might they do? *Biopestic Int* 2: 1-50.
- Hopkins DW & Gregorich EG (2003) Detection and decay of the Bt endotoxin in soil from a field trial with genetically modified maize. *European Journal of Soil Science* 54:793-800.

- Höfte H & Whiteley HR (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiological Reviews 53:242-255.
- Ingram J (2000) Report on the separation distances required to ensure cross-pollination is below specific limits in non-seed crops of sugar beet, maize and oilseed rape. MAFF Project No RG0123.
- Jesse LCH. & Obrycki JJ (2000) Field deposition of Bt transgenic corn pollen: lethal effects on the monarch butterfly. Oecologia 125:241-248.
- Jesse LCH. & Obrycki JJ (2003) Occurrence of *Danaus plexippus* L. (Lepidoptera : Danaidae) on milkweeds (*Asclepias syriaca*) in transgenic Bt corn agroecosystems. Agriculture Ecosystems and Environment 97:225-233.
- Jung HG & Sheaffer CC (2004) Influence of Bt Transgenes on Cell Wall Lignification and Digestibility of Maize Stover for Silage. Crop Science 44:1781-1789.
- Kania J, Keck P, Levine E & Sanders P (1995) Molecular analysis of insect protected maize line MON 810. Monsanto Technical Report MSL-14382, St. Louis.
- Kay R, Chan A, Daly M & McPherson J (1987) Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a stronger enhancer for plant genes. Science 236:1299-1302.
- Klee HJ & Rogers SG (1987) Cloning of an *Arabidopsis* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Sequence analysis and manipulation to obtain Glyphosate-tolerant plants. Mol Gen Genet 210:437-442.
- Kohli A, Leech M, Vain P, Lauri DA & Christou P (1998) Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. PNAS 95:7203-7208.
- Koskella J & Stozky G (2002) Larvicidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp, *kurstaki*, *morrisoni* (strain tenebrionis), and *israelensis* have no microbicidal or microbiostatic activity against selected bacteria, fungi, and algae in vitro. Canadian Journal of Microbiology 48: 262–267.
- Kålås JA, Viken Å & Bakken T (eds.) (2006) Norsk Rødliste 2006 - 2006 Norwegian Red List. Artsdatabanken, Trondheim, Norway. 416 pp.
- Lang A & Vojtech E (2006) The effects of pollen consumption of transgenic Bt maize on the common swallowtail, *Papilio machaon* L. (Lepidoptera, Papilionidae). Basic and Applied Ecology 7: 296-306.

- Li HR, Oppert B, Higgins RA, Huang FN, Buschman LL. & Zhu KY (2005) Susceptibility of Dipel-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera : Crambidae) to individual *Bacillus thuringiensis* protoxins. *Journal of Economic Entomology* 98:1333-1340.
- Lid J & Lid DT (2005) Norsk flora. Det Norske Samlaget, Oslo. 7. utgave. 1230 s.
- Losey JE, Rayer LS & Carter ME (1999) Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature* 399:214-214.
- Ludy C & Lang A (2006) A 3-year field-scale monitoring of foliage-dwelling spiders (Araneae) in transgenic Bt maize fields and adjacent field margins. *Biological Control* 38:314-324.
- Macintosh SC, Stone TB, Sims SR, Hunst PL, Greenplate JT, Marrone PG, Perlak FJ, Fischhoff DA, & Fuchs RL (1990) Specificity and Efficacy of Purified *Bacillus-Thuringiensis* Proteins against Agronomically Important Insects. *Journal of Invertebrate Pathology* 56:258-266.
- Malone LA & Pham-Delegue MH (2001) Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* sp.). *Apidologie* 32: 287-304.
- Meadow R 2007. Expected effects and side effects of approval for the use of maize MON 810 on target and non-target arthropods in and around maize fields in Norway. Rapport fra Bioforsk Plantehelse. 9 s.
- Meier MS & Hilbeck A (2001) Influence of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on prey preference of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera : Chrysopidae). *Basic and Applied Ecology* 2:35-44.
- Netherwood T, Martín-Orúe SM, O'Donnell AG, Gockling S, Graham J, Mathers JC & Gilbert HJ. (2004) Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nat Biotechnol* 22(2):204-209.
- Nielsen KM., van Elsas JD & Smalla K (2000). Transformation of *Acinetobacter* sp. 13(pFG4delta*aptII*) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Appl Environ Microbiol* 66: 1237-42.
- Nielsen KM (2003) An assessment of factors affecting the likelihood of horizontal transfer of recombinant plant DNA to bacterial recipients in the soil and rhizosphere. *Collection of Biosafety Reviews (Italy)*, Vol. 1. pp. 96-149.
- Odell JT, Nagy F & Chua NH (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313:810-812.
- 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.

- OECD (2007) Consensus Document on Safety Information on Transgenic Plants Expressing *Bacillus thuringiensis* – Derived Insect Control Proteins. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology (ENV/JM/MONO) No. 14:1-109.
- Pilcher CD, Obrycki JJ, Rice ME & Lewis LC (1997a) Preimaginal development, survival, and field abundance of insect predators on transgenic *Bacillus thuringiensis* corn. *Environmental Entomology* 26:446-454.
- Pilcher CD, Rice ME, Obrycki JJ & Lewis LC (1997b). Field and laboratory evaluations of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn on secondary lepidopteran pests (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 90:669-678.
- Puchta H (1999) Double-strand break-induced recombination between ectopic homologous sequences in somatic plant cells. *Genetics* 152:1173-1181.
- Ramirez-Romero, R., Chaufaux, Josette & Pham-Delegue, M.H. 2005. Effects of Cry1AB protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. *Apidologie* 36: 601-611.
- Register JC 3rd, Peterson DJ , Bell PJ, Bullock WP, Evans IJ, Frame B, Greenland AJ, Higgs NS, Jepson I, Jiao S, Lewnau CJ, Sillick JM & Wilson HM (1994) Structure and function of selectable and non-selectable transgenes in maize after introduction by particle bombardment. *Plant Mol Biol* 25:951-961.
- Rigden EC, Reiser SE & Lirette RP (2003) PCR and DNA sequence analysis of the insert in YieldGard corn borer event MON 810. Monsanto Technical Report MSL 18238.
- Rochester DA, Winer JA & Shah DM (1986) The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein, *hsp 70*. *The EMBO journal* 5:451-458.
- Romeis J, Dutton A & Bigler F (2004) *Bacillus thuringiensis* toxin (Cry1A(b)) has no direct effect on larvae of the green lacewing *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae). *Journal of Insect Physiology* 50:175-183.
- Rudi K, Rud I & Holck A (2003) A novel multiplex quantitative DNA array based PCR (MQDA-PCR) for quantification of transgenic maize in food and feed. *Nucleic Acids Res.* 31:e62
- Sears MK & Stanley-Horn D (2000) Impact of Bt corn pollen on monarch butterfly populations. *In: 'Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Symposium on The Biosafety of Genetically Modified Organisms.* University Extension Press, Canada.



- Sanders CJ, Pell JK, Poppy GM, Raybould A, Garcia-Alonso M & Schuler TH (2007) Host-plant mediated effects of transgenic maize on the insect parasitoid *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera : Ichneumonidae). *Biological Control* 40:362-369.
- Sanvido O, Widmer F, Winzeler M, Streit B, Szerencsits E & Biger F (2007) Definition and feasibility of isolation distances for transgenic maize cultivation. *TransgenicRes.* Online 12. juni 07.  
<http://www.springerlink.com/content/n561562061873351/>
- Saxena D & Stotzky G (2001) *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 33:1225–1230.
- Saxena D, Flores S & Stotzky G (2002) Bt toxin is released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events. *Soil Biology and Biochemistry*, 34:133–137.
- Scanlon NK & Jennings JC (2004) Confirmation of the absence of T-NOS in MON 810 by Southern blot analysis. Monsanto Technical Report MSL 19224.
- Schubbert GW, Lettmann C & Doerfler W (1994) Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice *Mol Gen Genet* 242:495-504.
- SCP (1998) Opinion of the Scientific Committee on Plants regarding the genetically modified, insect resistant maize lines notified by the Monsanto Company.  
[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scp/out02\\_en.html](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scp/out02_en.html)
- Shelton AM, Zhao JZ & Roush RT (2002) Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annual Review of Entomology* 47: 845-881.
- Sims SR & Martin JW (1997) Effects of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins Cry1A(b), Cry1A(c), CryIIA and CryIIIA on *Folsomia candida* and *Xenylla grisea* (Insecta: Collembola). *Pedobiologia* 41:412–416.
- Sisterson MS & Tabashnik BE (2005) Simulated effects of transgenic Bt crops on specialist parasitoids of target pests. *Environmental Entomology* 34:733-742.
- Tabashnik BE, Cushing NL, Finson N & Johnson MW (1990) Field Development of Resistance to *Bacillus-Thuringiensis* in Diamondback Moth (Lepidoptera, Plutellidae). *Journal of Economic Entomology* 83:1671-1676.
- Timko MP, Herdies L, de Alameida E, Cashmore AR, Leemans J & Kreffers E (1988) Genetic engineering of nuclear-encoded components of the photosynthetic apparatus of *Arabidopsis*. In *The Impact of Chemistry on Biotechnology – A Multidisciplinary Discussion*. ACS Books, Washington DC, pp 279-295.

- Treu R & Emberlin J (2000) Pollen dispersal in the crops maize (*Zea mays*), oil seed rape (*Brassica napus* ssp. *Oleifera*), potatoes (*Solanum tuberosum*), sugar beet (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*) and wheat (*Triticum aestivum*). Evidence from publications. A report for the Soil Assosiation, January 2000.
- Vercesi ML, Krogh PH & Holmstrup M (2006) Can *Bacillus thuringiensis* (Bt) corn residues and Bt-corn plants affect life-history traits in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*? Applied Soil Ecology 32:180-187.
- Vettori C, Paffetti D, Saxena D, Stotzky G & Giannini R (2003) Persistence of toxins and cells of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* introduced in sprays to Sardinia soils. Soil Biology and Biochemistry 35:1635-1642.
- Vieira J & Messing J (1987) Production of single stranded plasmid DNA. Meth Enzym. 153:3-11.
- VKM (2005) Report from an *Ad Hoc* Group appointed by the Norwegian Scientific Panel on Genetically Modified Organisms and Panel on Biological Hazards – An assessment on potentially long-term health effects caused by antibiotic resistance marker genes in genetically modified organisms based on antibiotic usage and resistance patterns in Norway. 62 p.
- VKM (2006) Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer. Vurdering av foreslåtte virkemidler for sameksistens mellom genmodifiserte vekster og konvensjonelt/økologisk landbruk, og rangering av spredningsrisiko av transgener fra relevante genmodifiserte planter som kan dyrkes i Norge. 34 s. <http://www.vkm.no>.
- VKM (2007) Uttalelse om Monsanto's genmodifiserte mais MON 810. 10 s. <http://www.vkm.no>
- Yanisch-Perron C, Vieira J & Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19 vectors. Gene 33:103-119.
- Zwahlen C, Nentwig W, Bigler F & Hilbeck A (2000) Tritrophic interactions of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn, *Anaphothrips obscurus* (Thysanoptera : Thripidae), and the predator *Orius majusculus* (Heteroptera : Anthocoridae). Environmental Entomology 29:846-850.
- Zwahlen C, Hilbeck A, Gugerli P & Nentwig W (2003a) Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field. Molecular Ecology 12:765-775.
- Zwahlen C, Hilbeck A, Howald R, Nentwig W (2003b) Effects of transgenic Bt corn litter on the earthworm *Lumbricus terrestris*. Molecular Ecology 12:1077-1086.