



**Helse- og miljørisikovurdering av genmodifisert
maislinje 98140 fra
Pioneer Hi-Bred. International Inc.
(EFSA/GMO/UK/2008/53)**

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

12.03.09

BIDRAGSYTERE

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

VURDERT AV

Faggruppe for genmodifiserte organismer:

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

Koordinatorer fra sekretariatet:

Arne Mikalsen og Merethe Aasmo Finne

SAMMENDRAG

Helse- og miljørisikovurderingen av den herbicidtolerante maislinjen 98140 fra Pioneer Hi-Bred International, Inc. (EFSA/GMO/UK/2008/53) er utført av Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet. Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning (DN) ber Vitenskapskomiteen for mattrygghet om å vurdere den genmodifiserte maislinjen 98140 til import og prosessering, og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Søknaden gjelder ikke dyrking.

Risikovurderingen av den genmodifiserte maisen er basert på dokumentasjonen som er gjort tilgjengelig på EFSAAs nettside GMO EFSAAnet. I tillegg er det benyttet informasjon fra uavhengige vitenskapelige publikasjoner i vurderingen. 98140 er risikovurdert i henhold til tiltenkt bruk og faggruppen har derfor ikke vurdert helse- og miljøeffekter knyttet til dyrking av maislinjen. Vurderingen er gjort i overensstemmelse med miljø- og helsekravene i genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven, samt kravene i EU-forordning 1829/2003/EF og utsetningsdirektiv 2001/18/EF med annekser. Det presiseres at de deler av den norske konsekvensutredningsforskriften som vedrører bærekraft, samfunnsnytte og etikk er utenfor VKMs mandat og ikke vurdert av faggruppen. Videre er EFSAAs retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter (EFSA 2006) og Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) konsensusdokument for mais (OECD 2002) lagt til grunn for vurderingen.

Den vitenskapelige vurderingen omfatter transformeringsprosess og vektorkonstruksjon, karakterisering og nedarving av genkonstruksjonen, komparativ analyse av ernæringsmessig kvalitet, vitaminer, mineraler, fettsyresammensetning, aminosyrer, kritiske toksiner, metabolitter, antinæringsstoffer, allergener og nye proteiner. Videre er agronomiske egenskaper, genoverføring og potensiale for ikke tilsiktede effekter på fitness vurdert.

Maislinjen 98140 er fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformasjon av umodne maisembryo fra en av Pioneers innavlede maislinjer. Maislinjen har fått innsatt en genkonstruksjon med en optimalisert form av *gat*-genet fra jordbakterien *Bacillus licheniformis*. Genet koder for GAT4621-proteinet, et N-acetyltransferase-enzym som medfører inaktivering av herbicider med virkestoff glyfosat. I tillegg uttrykker 98140 ZM-HRA-proteinet, som er en optimalisert form av endogent acetolaktatsyntase (ALS)-enzymet. Acetolaktatsyntase-enzymet (ALS) gir plantene toleranse mot herbicider med de aktive virkestoffene tifensulfuron og klorimuron. Maislinje 98140 inneholder ingen markgener for antibiotikaresistens.

Faggruppe for genmodifiserte organismer ser det som positivt at dokumentasjonen knyttet til søknad EFSA/GMO/UK/2008/53 ikke er klassifisert som konfidensiell og unntatt offentlighet.

Med unntak for vitamin C, er analysene av ernæringsmessige komponenter utført i tråd med OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002). Faggruppen understreker at konsensusdokumentet i størst mulig grad skal følges når det legges fram dokumentasjon på nivåene av næringsstoffer, antinæringsstoffer og metabolitter.

Vitamin C er ansett som et viktig vitamin i sukkermais, men faggruppen vektlegger at hoveddelen av maisforbruket i Norge er som dyrefôr, og at mais til human konsum utgjør mindre enn 1 % av energiinntaket både for voksne og barn under ett år. Når det gjelder dyrefôr ansees det naturlige vitamininnholdet i mais å være uten betydning da all mais som benyttes som fôr vitaminberikes i henhold til Mattilsynets anbefalinger. Tilsvarende angis krav til ernæringsmessig sammensetning av kornbasert barnemat i vedlegg 1 i Forskrift om bearbeidet kornbasert barnemat og annen barnemat til spedbarn og småbarn (FOR 2002-10-18 nr 1185). Faggruppen vurderer derfor at et eventuelt avvikende vitaminnivå i 98140 har liten ernæringsmessig betydning i Norge.

Det er påvist signifikante forskjeller mellom maislinje 98140 og kontroll i enkeltparametere. Verdiene for de analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i

litteraturen, samt innenfor toleranseintervallene for de umodifiserte referansesortene som er inkludert i søkers dokumentasjon.

Søker har foretatt analyser av N-acetylering av agrokjemikalier, antibiotika og aminosyrer. Det er ikke påvist N-acetylering av verken agrokjemikalier eller antibiotika, men det er påvist N-acetylering av noen aminosyrer. Faggruppen konkluderer med at selv om matvarer fra mais 98140 skulle føre til økt inntak av disse N-acetylerede aminosyrene vil inntaket ikke være av helsemessig betydning. Dette begrunnes med at N-deacetylaser (N-acylaser), som N-deacetylerer aminosyrer og andre N-acetylerede forbindelser, er utbredt i pattedyr, bl.a. i tarmvev og i magesekk.

GAT4621- og ZM-HRA – proteinene, som uttrykkes som følge av genmodifiseringen, har ingen likheter med kjente toksiner og allergener, eller egenskaper som tilsier at det vil virke som et allergen eller toksin.

Faggruppen finner det lite sannsynlig at eksponering av GAT4621- og ZM-HRA – proteinene i seg selv og i de mengder som tilføres via genmodifisert mais er helsemessig betenkelig. Føringstudier på rotter viser ingen skadelige helseeffekter. Videre konkluderer ernæringsstudier med broilere med at maislinjen 98140 er ernæringsmessig lik umodifisert mais. Faggruppen mener derfor at 98140 brukt som mat og fôrvarer ikke medfører endret helserisiko i forhold til annen mais.

Faggruppen har ikke vurdert problematikken knyttet til eventuelle rester av glyfosat, AMPA, tifensulfuron, klorimuron eller nedbrytingsprodukter i mat- og fôrprodukter av 98140. Faggruppen legger imidlertid til grunn at produkter, der verdiene ligger under grenseverdiene for akseptabelt daglig inntak, ikke innebærer endret helserisiko i forhold til annen mais.

Med unntak for herbicidtoleranse viser feltforsøk ingen signifikante forskjeller mellom den transgene maishybrid 98140 og kontrollinjer med hensyn på agronomiske og morfologiske karakterer.

Søknaden gjelder godkjenning av maislinjen 98140 for import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av maislinjen. Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av maislinjen i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Norge er i utkanten av dyrkingsområdet for mais, dyrkingsområdet er svært begrenset og det er ingen stedegne eller introduserte viltvoksende arter som mais kan hybridisere med.

Samlet vurdering

Faggruppe for genmodifiserte organismer finner det lite trolig at den omsøkte bruken av maislinje 98140 vil medføre endret risiko for helse og miljø i forhold til annen mais.

NØKKEWORD

Mais, *Zea mays* (L.), genmodifisert maislinje 98140, herbicidtoleranse, GAT4621-protein, glyfosatacetyltransferase (GAT), ZM-HRA-protein (ALS protein), acetolactatsyntase (ALS), glyfosat, tifensulfuron, klorimuron, helsemessig trygghet, helse, miljørisiko, forordning 1829/2003/EF

FORKORTELSER OG ORDFORKLARINGER

| | |
|--------------------|--|
| ADF | Acid detergent fiber, fiberfraksjon av ufordøyelig plantemateriale i fôr, vanligvis cellulosefiber dekket med lignin og silikat. Plantematerialet fordøyes med en syre-detergentløsning (ADF). Ufordøyd masse betegnes som ADF. Fôr med lavt ADF-innhold er mer fordøyelig og har større energiinnhold. |
| Allel | Et bestemt gen kan foreligge i ulike varianter (alleler). Allelene kan være dominante (bestemmende for fenotypen) eller recessive (vikende). |
| ALS | Acetolactatsyntase-enzym |
| AMPA | Aminomethylphosphonic acid, nedbrytningsprodukt fra glyfosat. |
| ARMG | Antibiotikaresistensmarkørgen |
| Backcross (BC) | Tilbakekryssing. Kryssing mellom en hybridlinje (avkom fra to genetisk ulike foreldre) og en av foreldrelinjene, alternativt en genetisk ekvivalent organisme. Strategi i planteforedling for å overføre primært kvalitative karakterer, for eksempel sjukdomsresistens, til elitelinjer av både kryssbefruktede og selvpollinerte arter. Gjentatte tilbakekryssinger reduserer det genetiske bidraget, som uønskede alleler fra den andre donorplanten. |
| | BC ₁ , BC ₂ etc: betegnelse på 1. og 2. tilbakekryssingsgenerasjon, etc. |
| BLASTn | Algoritme som benyttes for homologisammenligning av nukleotidsekvenser. |
| BLASTP | Algoritme som benyttes for homologisammenligning av aminosyresekvenser i proteiner. |
| BLASTx | Algoritme som benyttes for oversetting fra kodende nukleotidsekvenser til aminosyresekvenser. |
| bp | Basepar |
| Codex | FAO/WHO-organ som etablerer globale handelsstandarder for mat. |
| DN | Direktoratet for naturforvaltning |
| DNA | Deoxyribonukleinsyre (DNA.) |
| EFSA | European Food Safety Authority. |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| EPSPS | 5-enolpyruvylsukinat-3-fosfat-syntetase |
| FAO | Food and Agriculture Organization, FN's organisasjon for ernæring og landbruk. |
| FIFRA | US EPA Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act. USAs føderale lov om insektdrepende midler, soppdrepende midler og midler mot skadedyr. |
| Fitness | Et individs relative evne til å føre sine gener/alleler videre til kommende generasjoner. |
| GAT | Glyfosatacetyltransferase-enzym |
| GLP | Good Laboratory Practices, retningslinjer for godt laboratoriearbeid. |
| Glyfosat | Bredspektret herbicid |
| GMO | Genmodifisert organisme |
| GMP | Genmodifisert plante |
| Herbicid | Ugrasmiddel |
| <i>In vitro</i> | I glass, dvs. i laboratoriet, utenom organismen. Ved <i>in vitro</i> -undersøkelser studerer man prosesser i reagensglass o.l. Brukes bl.a. om laboratorieundersøkelser av vev og cellekulturer. Motsatt av <i>in vivo</i> . |
| Intron | Ikke-kodende områder i et eukaryot gen. |
| Locus | Spesifikk posisjon på kromosomet der et gen er lokalisert. |
| MALDITOF | Massespektrometrimetode for å måle molekylvekt til peptider. |
| Mendelsk nedarving | Lovmessig nedarvingsmønster ved ulike typer kryssinger. |
| MT | Mattilsynet |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information (NCBI) er en del av USAs National Library of Medicine (NLM), som er en gren av National Institutes of Health (NIH). NCBIs database huser genomsekvensdata i GenBank. |
| NDF | Neutral detergent fiber, dvs. fiberfraksjon som inneholder hemicellulose og ADF. |

| | |
|-----------------------------|--|
| Northern blot | Teknikk for overføring av RNA til en membran for videre studier av overførte RNA-sekvenser. |
| Nucosulfuron | Smalspektret herbicid, hemmer ALS enzymer. |
| Nær-isogen linje | Linjer eller sorter som er genetisk identiske, med unntak av ett locus eller kromosomsegment. |
| OECD | Organisation for Economic Co-operation and Development |
| ORF | Open Reading Frame (åpen leseramme) |
| PCR | Polymerase chain reaction. Polymerase kjedereaksjon. Metode for å syntetisere mange kopier av en DNA-sekvens vha primere. |
| Rimsulfuron | Smalspektret herbicid som hemmer ALS enzymer. |
| RNA | Ribonukleinsyre |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat (SDS)-polyakrylamidelektroforese. Elektroforesemetode for separasjon av proteiner. |
| Southern blot | Teknikk for overføring av DNA til en membran for videre studier av overførte DNA-sekvenser. |
| T-DNA | DNA fra Ti-plasmidet i jordbakterien <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Ti-plasmidets T-DNA (Transfer-DNA), overføres fra bakterien og settes inn i plantecellers kjernegenom. T-DNAet som overføres avgrenses av V (venstre) og H (høyre) flankesekvenser, og begrenser derfor delen av Ti-plasmidet som overføres og gjør at resten av vektoren ikke blir satt inn på plantekromosomene. |
| U.S. EPA | United States Environmental Protection Agency, USAs miljøvernmyndigheter |
| Utviklingsstadier hos mais: | |
| | <u>Vegetative stadier</u> |
| | VE: oppspiring |
| | V1: 1. blad |
| | V2: 2. blad |
| | V(n): n'te blad |
| | VT: synlige hannblomsterstand (tassel) |
| | <u>Reproduktive stadier</u> |
| | R1: synlige hunnblomster |
| | R2: 'blister' |
| | R3: melkmodning |
| | R4: deigmodning |
| | R5: dent |
| | R6: fysiologisk moden |
| Vektor | En molekylærbiologisk vektor (kloningsvektor) er et kunstig fremstilt DNA-molekyl som benyttes for å overføre genetisk materiale til en celle. De fire hovedtypene av vektorer er plasmider, bakteriofager og andre virus, kosmider og kunstige kromosomer. |
| Western-blot | Metode for overføring av proteiner til en membran, som letter videre studier. |
| WHO | World Health Organisation. Verdens helseorganisasjon, organ under FN. |
| ZM-HRA | ZM står for <i>Zea mays</i> (<i>Zm</i> hvis det hadde vist til genet), og HRA er et acetolaktatenzym fra mais. Enzymet er blitt endret ved at to aminosyrer er byttet ut. Enzymet er tolerant for herbicider som hemmer ALS-enzymet. |

INNHOLDSFORTEGNELSE

| | |
|--|----|
| BIDRAGSYTERE..... | 2 |
| VURDERT AV | 2 |
| SAMMENDRAG | 3 |
| NØKKEWORD | 5 |
| FORKORTELSER/ORDFORKLARINGER | 6 |
| INNHOLDSFORTEGNELSE | 8 |
| BAKGRUNN | 9 |
| OPPDRAK FRA DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING OG MATTILSYNET | 9 |
| RISIKOVURDERING | 10 |
| 1. Innledning | 10 |
| 1.1. Beskrivelse av egenskaper og virkningsmekanismer | 10 |
| 2. Molekylær karakterisering | 10 |
| 2.1. Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon..... | 10 |
| 2.2. Karakterisering av geninnsettingen/ genkonstruksjonen | 11 |
| 2.3. Informasjon vedr. uttrykk av introduserte gener, åpne leserammer (ORF) | 12 |
| 2.4. Nedarving og stabilitet av innsatt DNA..... | 15 |
| 2.5. Delkonklusjon..... | 15 |
| 3. Komparative analyser | 17 |
| 3.1. Forsøksdesign og valg av komparator | 17 |
| 3.2. Analyser av ernæringsmessige komponenter | 17 |
| 3.3. Agonomiske egenskaper..... | 20 |
| 3.4. Delkonklusjon..... | 20 |
| 4. Dokumentasjon av toksisitet og allergenisitet..... | 21 |
| 4.1. Toksisitet | 21 |
| 4.2. Allergenisitet | 24 |
| 4.3. Delkonklusjon..... | 24 |
| 5. Miljørisikovurdering | 25 |
| 5.1. Potensiale for utilsiktede effekter på fitness relatert til genmodifiseringen | 25 |
| 5.2. Potensiale for genoverføring..... | 25 |
| 5.3. Overvåking | 26 |
| 5.4. Delkonklusjon..... | 27 |
| 6. Vurdering av søkers dokumentasjon..... | 27 |
| KONKLUSJON | 29 |
| REFERANSER | 31 |

BAKGRUNN

Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet er bedt av Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning om å foreta en utredning av helse- og miljørisiko ved en eventuell godkjenning av den genmodifiserte maislinjen 98140 fra Pioneer Hi-Bred International, Inc. (EFSA/GMO/UK/2008/53). Maislinjen er søkt omsatt i EU/EØS-området under Forordning (EF) No. 1829/2003 om genmodifiserte næringsmidler og fôrvarer (artiklene 3(1) og 15(1)). Søknaden omfatter bruksområdene import, prosessering, næringsmidler og fôrvarer, men inkluderer ikke dyrking.

Søknaden ble fremmet og anbefalt av britiske myndigheter i april 2008. Dokumentasjonen knyttet til søknaden ble lagt ut på EFSA-nett 12. november 2008, med frist på 90-dager for innspill fra EU- og EØS/EFTA-landene. Norge har ikke tidligere uttalt seg om mais 98140.

Utenfor EU/EØS-området er 98140 godkjent for omsetning som mat og fôr i USA (Agbios 2009). I tillegg oppgir søker at maislinjen er søkt godkjent for dyrking i USA og Canada, og for alle bruksområder i Mexico.

OPPDRAK FRA DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING OG MATTILSYNET

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

Søknad EFSA/GMO/UK/2008/53, genmodifisert maislinjen 98140, ble lagt ut på EFSA-nett 12. november 2008. Faggruppe for genmodifiserte organismer skal i tråd med oppdragsbrev utarbeide helse- og miljørisikovurdering av maislinjen til import og industriell prosessering, samt til bruk som næringsmiddel og fôrvare. Søknaden omfatter ikke dyrking. Vurderingen skal utføres i henhold til tiltenkt bruk og i overensstemmelse med prinsippene som er nedfelt i EFSA-s retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter ("Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed") (EFSA 2006).

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

Produktet som ønskes vurdert

Genmodifisert mais, EFSA/GMO/UK/2008/53 (98140).

Unik kode: DP-Ø9814Ø-6.

Status i EU: Søknad under forordning 1829/2003/EF. Frist for innspill til EFSA-nett er 12.02.09.

Ønsket svarfrist til Mattilsynet/DN: 9.02.09.

RISIKOVURDERING

1. Innledning

Helse- og miljøvurderingen av den genmodifiserte mais 98140 er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSAs nettside GMO EFSA-net. I tillegg er det benyttet uavhengige vitenskapelige publikasjoner med referee i vurderingen. Vurderingen er gjort i henhold til tiltenkt bruk og i overensstemmelse med miljø- og helsekravene i genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven. Videre er kravene i EUs forordning 1829/2003/EF og utsettingsdirektiv 2001/18/EF med annekser lagt til grunn for vurderingen.

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

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

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

1.1. Beskrivelse av egenskaper og virkningsmekanismer

Maislinjen 98140 er fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformasjon av umodne maisembryo fra en av Pioneers innavlede maislinjer. Maislinjen har fått innsatt en genkonstruksjon med en optimalisert form av *gat*-genet fra jordbakterien *Bacillus licheniformis*. Genet koder for GAT4621-proteinet, et N-acetyltransferase-enzym som medfører inaktivering av herbicider med virkestoff glyfosat. I tillegg uttrykker 98140 ZM-HRA-proteinet fra mais, et acetolaktatsyntase enzym (ALS) som gir plantene toleranse mot herbicider med virkestoff tifensulfuron og klorimuron. Maislinje 98140 inneholder ingen markørgener for antibiotikaresistens.

2. Molekylær karakterisering

2.1. Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

I følge søkers dokumentasjon er det benyttet *Agrobacterium*-mediert transformasjon av umodne maisembryo fra en av Pioneers innavlede maislinjer (PHWVZ). Den binære vektoren PHP24279, som inneholder et rekombinant DNA-fragment, ble benyttet til å transformere celler fra den umodifiserte maislinjen. Et rekombinante DNA-fragment (T-DNA) på 7386 basepar (bp) er satt inn i maisgenomet. T-DNAet inneholder en *gat4621*- og en *zm-hra*-ekspresjonskasset. Transformanter ble selektert ved at de overlevde og vokste i nærvær av glyfosat.

Den ene kassetten koder for GAT4621-protein. GAT4621 er et N-acetyltransferase-enzym og tilhører GCN5-acetyltransferasefamilien, også kalt GNAT-familien. GNAT-familien består av over 10 000 gener og er representert i alle riker. GAT4621 acetylerer det sekundære aminet i glyfosat, som medfører at glyfosat inaktiveres. ZM-HRA-ekspresjonskassetten danner ZM-HRA-proteinet. ZM-

HRA er et syntetisk acetolaktatsyntase enzym (ALS) fra mais. Enzymet hemmes ikke av herbicider som hemmer enzymer i ALS-familien. PHP24279 DNA-fragmentet inneholder ikke antibiotikaresistensen.

2.2. Karakterisering av geninnsettingen/ genkonstruksjonen

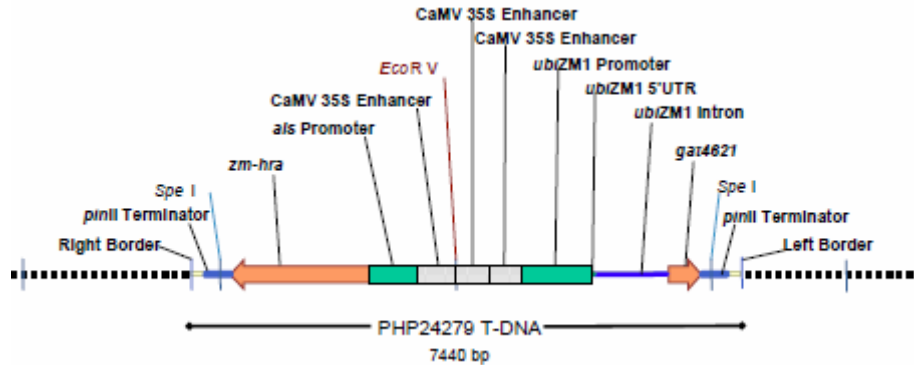
Beskrivelse av de innsatte genene

DNA fragmentet inneholder følgende gener og DNA-elementer (tabell 1).

Tabell 1. Genelementer i T-DNA-området til plasmidet PHP24279 (Pioneer Hi-Bred Int. 2008).

| Location on T-DNA (base pair position) | Genetic element | Size (base pairs) | Function |
|--|-------------------------|-------------------|---|
| 1 to 25 | Right Border | 25 | T-DNA Right Border region, from Ti plasmid of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> |
| 26 to 177 | Ti plasmid region | 152 | Non-functional sequence from Ti plasmid of <i>A. tumefaciens</i> |
| 178 to 210 | Polylinker region | 33 | Region required for cloning genetic elements |
| 211 to 521 | <i>pinII</i> terminator | 311 | Terminator region from <i>Solanum tuberosum</i> proteinase inhibitor II gene (Keil <i>et al.</i> , 1986; An <i>et al.</i> , 1989) (reverse orientation) |
| 522 to 537 | Polylinker region | 33 | Region required for cloning genetic elements |
| 538 to 2454 | <i>zm-hra</i> gene | 1917 | Optimised version of the endogenous <i>Zea mays</i> acetolactate synthase gene (Fang <i>et al.</i> , 1992) (reverse orientation) |
| 2455 to 3115 | <i>zm-als</i> promoter | 661 | Promoter region from <i>Zea mays</i> acetolactate synthase gene (Fang <i>et al.</i> , 1992) (reverse orientation) |
| 3116 to 3189 | Polylinker region | 74 | Region required for cloning genetic elements |
| 3190 to 3625 | CaMV 35S enhancer | 436 | Enhancer region from the Cauliflower Mosaic Virus genome (Franck <i>et al.</i> , 1980; Odell <i>et al.</i> , 1985) |
| 3626 to 3648 | Polylinker Region | 23 | Region required for cloning genetic elements |
| 3649 to 4086 | CaMV 35S enhancer | 438 | Enhancer region from the Cauliflower Mosaic Virus genome (Franck <i>et al.</i> , 1980; Odell <i>et al.</i> , 1985) |
| 4087 to 4093 | Polylinker region | 7 | Region required for cloning genetic elements |
| 4094 to 4531 | CaMV 35S enhancer | 438 | Enhancer region from the Cauliflower Mosaic Virus genome (Franck <i>et al.</i> , 1980; Odell <i>et al.</i> , 1985) |
| 4532 to 4566 | Polylinker region | 35 | Region required for cloning genetic elements |
| 4567 to 5466 | <i>ubiZM1</i> promoter | 900 | Promoter region from <i>Zea mays</i> ubiquitin gene (Christensen <i>et al.</i> , 1992) |
| 5467 to 5549 | <i>ubiZM1</i> 5' UTR | 83 | 5' untranslated region from <i>Zea mays</i> ubiquitin gene (Christensen <i>et al.</i> , 1992). |
| 5550 to 6558 | <i>ubiZM1</i> intron | 1009 | Intron region from <i>Zea mays</i> ubiquitin gene (Christensen <i>et al.</i> , 1992) |
| 6559 to 6586 | Polylinker region | 28 | Region required for cloning genetic elements |
| 6587 to 7030 | <i>gat4621</i> gene | 444 | Optimised glyphosate N-acetyltransferase gene (Castle <i>et al.</i> , 2004. Siehl <i>et al.</i> , 2007) |
| 7031 to 7046 | Polylinker region | 16 | Region required for cloning genetic elements |
| 7047 to 7362 | <i>pinII</i> terminator | 316 | Terminator region from <i>Solanum tuberosum</i> proteinase inhibitor II gene (Keil <i>et al.</i> , 1986; An <i>et al.</i> , 1989) |
| 7363 to 7415 | Ti plasmid region | 53 | Non-functional sequence from Ti plasmid of <i>A. tumefaciens</i> |
| 7416 to 7440 | Left Border | 25 | T-DNA Left Border region, from Ti plasmid of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> |

Southern blot og PCR er benyttet for å karakterisere det rekombinante DNA-fragmentet i planten. *Zm-hra*- og *gat4621*-genkassetene er orientert motsatt i forhold til hverandre. Molekylærbiologisk karakterisering viser at det er satt inn bare en kopi av DNA-fragmentet i maisens genom.



Figur 1. Rekombinant PHP24279 DNA-fragment i maisens genom. Områdene utenfor PHP24279 er genomisk DNA.

Molekylærbiologiske analyser viser at det rekombinante fragmentet på 7386 bp i planten inneholder de samme gener og genelementer som er på det tilsvarende DNA-fragmentet i plasmidet PHP24279. Det rekombinante innskuddet mangler 30 bp i høyre grense og 24 bp i venstre grense i forhold til det rekombinante DNA-fragmentet i den binære vektoren PHP24279.

GAT4621- og ZM-HRA-genene ble klonet inn i *E. coli*-bakterier for å få tilstrekkelig mengde proteiner for analyser som krever relativt mye protein. Både GAT4621- og ZM-HRA- proteinet som uttrykkes i mais er undersøkt med Western-blot analyse og densitometri, SDS-PAGE og densitometri, trypsinbehandling av proteinene og peptidkartlegging med MALDITOF massespektrometri, analyse av N-enden til proteinene, samt glykosyleringsanalyse. Proteinene er undersøkt for enzymaktivitet. Analysene viser at GAT4621 og ZM-HRA proteinene er strukturelt og funksjonelt like de *E. coli*-produserte proteinene. Fordøyelighetstest av GAT4621- og ZM-HRA-proteiner produsert i *E. coli*, viste at proteinene fordøyes raskt i simulert magesaft og tarmsaft. Det ble heller ikke påvist glykosyleringsseter på disse proteinene. Southern-blot analysene er utført på DNA rensset ut fra blad.

PCR-analyser av det rekombinante DNA fragmentet på 7386 bp i 98140 viser at flankesekvensene til fragmentet er genomisk DNA fra mais. Flankerende sekvenser til dette rekombinante DNA-fragmentet er sekvensert, 2310 bp oppstrøms (5'-flankesekvens) og 2027 bp nedstrøms (3'-flankesekvens).

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

Proteinuttrykk

Pioneer viser til at konsentrasjonen av GAT4621- og ZM-HRA-protein er målt i prøver fra feltforsøk i USA og Canada i 2006 og 2007. Se kap. 3.1 for beskrivelse av forsøksdesign og –metodikk. Ekspresjonen av GAT4621- og ZM-HRA-proteinene ble målt ved hjelp av enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) i ulike plantevev på fire ulike utviklingsstadier (V9, R1, R4, R6) i henholdsvis usprøytet 98140, og 98140 behandlet med enten glyfosat, nucosulfuron + rimsulfuron, eller glyfosat + nucosulfuron + rimsulfuron. Det ble tatt prøver av blad, røtter, stilk, hel plante, forfraksjon og frø. Med unntak for ZM-HRA-protein, som var under deteksjonsgrensen i pollen, ble begge proteinene detektert i alle undersøkte plantevev og utviklingsstadier. Dette er som forventet

siden både *gat4621*- og *zm-hra*-genet er under kontroll av konstitutive promotorer. Uttrykket av GAT4621- og ZM-HRA- proteinene som ble observert var uavhengig av sprøytereime.

I gjennomsnitt over alle utviklingsstadier varierte konsentrasjonen av GAT4621-protein i frø i begge forsøksårene mellom 7,4 og 11 ng/mg tørrvekt (t.v.) (tabell 3 og 4). Tilsvarende ble nivået av ZM-HRA-protein i frø målt til 0,34 til 0,36 ng/mg t.v. I bladvev varierte nivået av GAT4621 mellom 1,5-4,3 i R6 og 51-58 ng/mg t.v. i R1, mens verdiene i pollen ble målt til 13-14 ng/mg t.v. I prøver av røtter og forfraksjon ble nivået av GAT4621 målt til henholdsvis 2,6-16 ng/mg t.v. og 16-17 ng/mg t.v. Gjennomsnittlige konsentrasjon av ZM-HRA-protein i blad varierte mellom deteksjonsgrensen (<0,22 ng/mg t.v.) og 17 ng/mg t.v., mens tilsvarende nivåer i prøver av rot og fôr ble målt til henholdsvis 0,03-0,92 ng/mg t.v. og 1,9-2,7 ng/mg t.v.

Tabell 3. Ekspresjonsnivå av proteinene GAT4621 og ZM-HRA i frø fra 98140-planter, behandlet med ulike herbicidregimer. Fra feltforsøk i USA og Canada vekstsesongen 2006.

| | Mean (ng/mg d. w.) | Min/max range (ng/mg d. w.) | Standard deviation |
|---|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| GAT4621 protein | | | |
| 98140 maize untreated | 7.9 | 0.14 – 0.38 | 3.5 |
| 98140 maize treated with glyphosate | 7.7 | 3.6 – 12 | 2.0 |
| 98140 maize treated with ALS-inhibiting herbicides | 7.4 | 5.6 – 10 | 1.7 |
| 98140 maize treated with glyphosate and ALS-inhibiting herbicides | 7.4 | 3.9 – 12 | 2.1 |
| ZM-HRA protein | | | |
| 98140 maize untreated | 0.34 | 0 – 0.92 | 0.27 |
| 98140 maize treated with glyphosate | 0.34 | 0.14 – 0.89 | 0.27 |
| 98140 maize treated with ALS-inhibiting herbicides | 0.34 | 0 – 0.85 | 0.26 |
| 98140 maize treated with glyphosate and ALS-inhibiting herbicides | 0.34 | 0 – 0.96 | 0.27 |

Tabell 4. Ekspresjonsnivå av proteinene GAT4621 og ZM-HRA i frø fra 98140-planter, behandlet med ulike herbicidregimer. Fra feltforsøk i USA og Canada vekstsesongen 2007.

| | Mean (ng/mg d. w.) | Min/max range (ng/mg d. w.) | Standard deviation |
|---|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| GAT4621 protein | | | |
| 98140 maize untreated | 8.8 | 3.6-14 | 3.1 |
| 98140 maize treated with glyphosate | 9.8 | 6.6-14 | 2.2 |
| 98140 maize treated with ALS-inhibiting herbicides | 10 | 6.6-17 | 2.9 |
| 98140 maize treated with glyphosate and ALS-inhibiting herbicides | 11 | 6.3-18 | 2.9 |
| ZM-HRA protein | | | |
| 98140 maize untreated | 0.36 | 0.27-0.36 | 0.12 |
| 98140 maize treated with glyphosate | 0.35 | 0.27-0.60 | 0.094 |
| 98140 maize treated with ALS-inhibiting herbicides | 0.35 | 0.27-0.60 | 0.11 |
| 98140 maize treated with glyphosate and ALS-inhibiting herbicides | 0.36 | 0.27-0.60 | 0.10 |

Åpne leserammer

Ved hjelp av sekvensering og PCR ble sekvenser til 5' og 3' genomisk grenseområde til det rekombinante DNA-fragmentet vist å være lik genomsekvenser som finnes i kontrollplantene. Både 5'- og 3'-flankesekvenser ble undersøkt med BLASTn og BLASTx analyse for å undersøke egenskapen(e) og eventuelle funksjoner til flankesekvensene. Analysene resulterte i tallrike signifikante treff på offentlige maisgenomsekvenser. BLASTn analyse av 5' og 3' flankeområdene til DNA-fragmentet viser stor identitet til mais-genomsekvenser som foreligger i offentlige og proprietære databaser. Ingen av disse mais-genomsekvensene har egenskaper som fører til at de kan uttrykkes som proteiner. Det ble påvist 6 åpne leserammer (ORF). Teoretisk sett uttrykker disse leserammene peptider som har fra 16 til 72 aminosyrer. Ingen åpne leserammer større enn 100 aminosyrer ble påvist i områdene som omfatter forbindelsen mellom genomsekvenser og innskuddets sekvenser.

BLASTn-, BLASTP-, og BLASTx-søkene er utført for om mulig å identifisere og undersøke for potensielle allergener, toksiner og proteiner av antinæringskarakter. Teoretiske analyser av mulige polypeptider fra hver leseramme v.h.a. databasene allergen (FARRP8 database fra Nebraska universitet)- og toksin (NCBI-proteindatabase, SWISS-PROT, PIR, PRF, PDB) viser ingen biologisk relevante strukturelle likheter til allergener, proteiner som fører til cøliaki, antinæringsproteiner eller toksiner. Resultatene fra disse teoretiske analysene viser at det er lite sannsynlig at dersom noen av

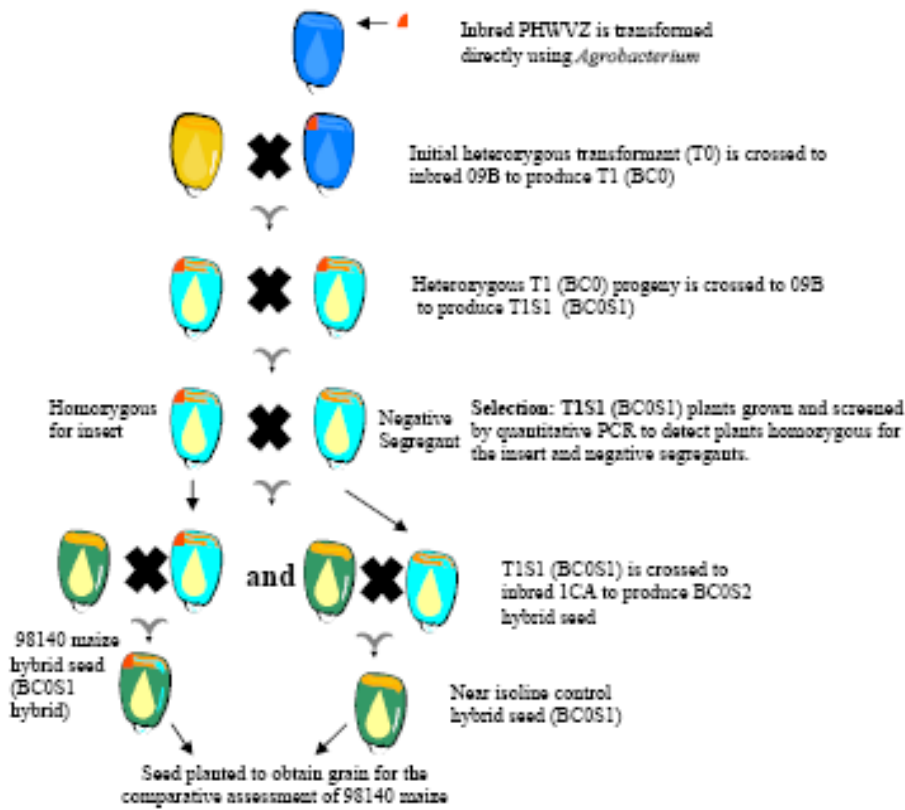
disse leserammene skulle bli transkribert vil det resultere i polypeptider som medfører potensielle toksiske, allergene eller uheldige helsemessige konsekvenser

2.4. Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

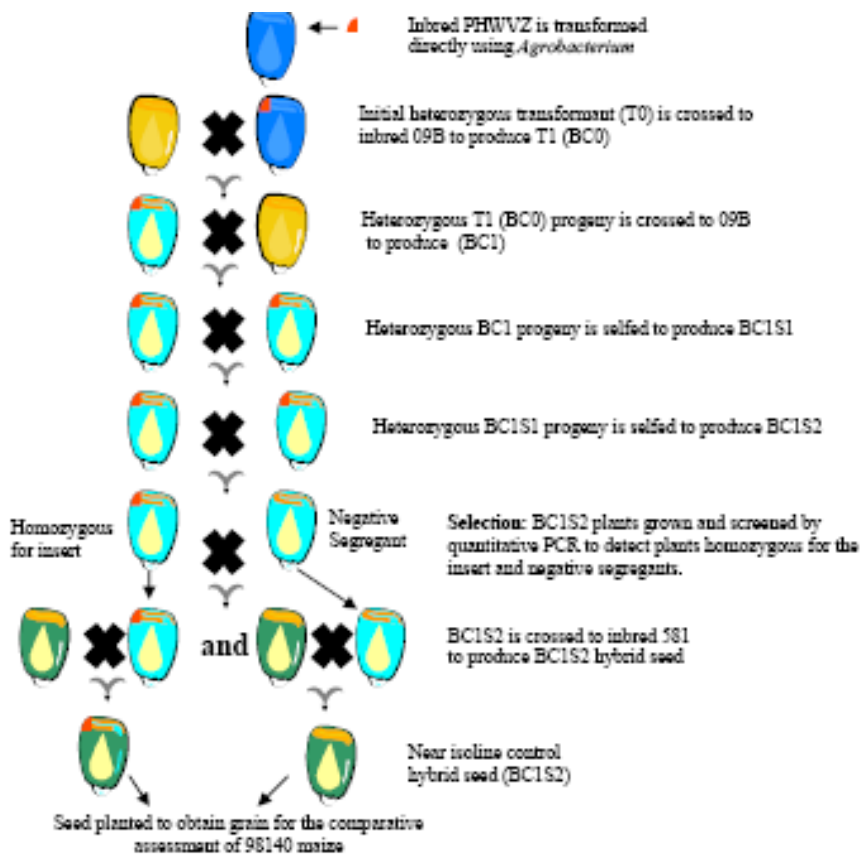
I henhold til dokumentasjonen fra Pioneer er genotypisk og fenotypisk stabilitet vist ved Southern blot, samt analyser av proteinekspressjon og fenotypiske/agronomisk karakterer. Genetisk stabilitet ble evaluert i tilbakekryssingsgenerasjonene BC1 og BC0S2 (fig. 2). Det ble ikke funnet forskjeller i båndmønstre mellom de ulike generasjonene, og det konkluderes med at det er kun én kopi av ekspressjonskassetten i maislinjen 98140. Analyse av spaltingsdata fra generasjon BC1S1 viser et forventet segregeringsmønster på 3:1 for det rekombinante DNA-fragmentet. Dette viser at nedarvingen av DNA-fragmentet i 98140 følger mønsteret for mendelsk nedarving av et enkelt, dominant locus. Analyser over stabiliteten av det innsatte rekombinante fragmentet synes å være tilstrekkelig.

2.5. Delkonklusjon

Faggruppen har vurdert de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av proteinene og finner at informasjonen er tilstrekkelig. Faggruppen konkluderer med at karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i 98140 er tilfredsstillende.



2006



2007

Fig. 2. Kryssingsskjema som viser produksjon av testlinje 98140 og nær-isogen kontroll for feltforsøkene i 2006 og 2007.

3. Komparative analyser

3.1. Forsøksdesign og valg av komparator

I følge dokumentasjonen fra Pioneer er den transgene maislinjen testet i en serie feltforsøk i USA og Canada i vekstsesongene 2006 og 2007 (Study Number: PHI-2006-038, PHI-2007-033). Forsøkene var lokalisert på henholdsvis 4 og 2 steder i sentrale dyrkingsområder for mais i USA (Iowa, Illinois og Nebraska) og Canada (Ontario).

De nær-isogene maislinjene BCOS1 og BC1S2 ble benyttet som kontrollsorter i hvert av forsøksårene. BCOS1 og BC1S2 har tilnærmet samme genetiske bakgrunn som den transgen linjen, men inneholder ikke det rekombinante DNA-fragmentet og uttrykker ikke GAT4621- og ZM-HRA- proteiner. De nær-isogene linjene er negative segreganter som ble selektert fra spaltingspopulasjonen i siste trinn før produksjon av hybridlinjer (fig. 2).

Feltforsøkene ble lagt ut som fullstendig randomiserte blokkdesign med 4 gjentak. Tre av blokkene på hvert forsøksfelt ble benyttet til komparative analyser, mens en av blokkene ble benyttet til prøveuttak for analyser av proteinekspressjon. Forsøksruter med testlinjen 98140 var enten ubehandlet, eller sprøytet, med henholdsvis glyfosat, nicosulfuron og rimsulfuron, eller med alle tre herbicidene glyfosat, nicosulfuron og rimsulfuron.

Det ble ikke benyttet kommersielle maissorter som referansemateriale i disse forsøkene. Søker har imidlertid lagt ved dokumentasjon (Study PHI 2003-031) over et feltforsøk med fire umodifiserte, kommersielle maissorter (Pioneer 34M94, Pioneer 33G26, Pioneer 33J24 og Pioneer 3394). Forsøket ble gjennomført på seks ulike lokaliteter i USA. Hensikten med studien var å bestemme toleranseintervallet for vurdering av ernæringsmessige komponenter og agronomisk ekvivalens.

Statistiske analyser

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

3.2. Analyser av ernæringsmessige komponenter

Hovedkomponenter i mais

Valg av analyseparametere er utført i henhold til OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002). Det er foretatt er rekke analyser av hovedkomponenter i fôr og maiskorn/frø. Forsøkene i 2006 er imidlertid ikke analysert med hensyn på komponenter i fôr.

Dokumentasjonen fra søker inneholder analyser av konsentrasjon av GAT4621 - og ZM-HRA-protein i stilk, hel plante og rot. Fôrfraksjonen er analysert for innhold av aske, fett, protein, total fiber, ADF (acid detergent fiber), NDF (neutral detergent fiber), og karbohydrater, mens følgende parametere er undersøkt i frø: protein, fett, aske, karbohydrater, ADF, NDF, total fiber, karbohydrater, aminosyrer, fettsyrer (C8-C24), fosfor, jern, kalium, kalsium, kobber, magnesium, mangan, natrium, sink, vitaminene B1 (tiamin), B2 (riboflavin), B3 (niacin), B5 (pantotensyre), B6 (pyridoksim), totalmengde vitamin E, α -tokoferol β -tokoferol, δ -tokoferol, γ -tokoferol og folinsyre (vitamin B9), antinæringsstoffene raffinose, inositol, fytinsyre og trypsinhemmer, samt de sekundære metabolittene furfural, cumarsyre og ferulsyre. Analysene ble utførte under god laboratoriepraksis (GLP).

Analyser av fôrfraksjon

I henhold til søker viser kombinerte analyser over lokaliteter og år ingen signifikante forskjeller mellom den transgene linjen og kontroll for de analyserte komponentene. Komponentene som ble analysert var aske, fett, protein, total fiber, ADF (acid detergent fibre), NDF (neutral detergent fibre) kalsium, fosfor og karbohydrater. For samtlige analyserte komponenter ligger verdiene innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen, og toleranseintervallene for Pioneers referansesorter som inngikk i studien.

Analyser i maiskorn

I henhold til søker viser kombinerte analyser over lokaliteter og år ingen signifikante forskjeller mellom den transgene linjen og kontroll for de analyserte komponentene. Komponentene som ble analysert var aske, fett, protein, total fiber, ADF (acid detergent fibre), NDF (neutral detergent fibre), og karbohydrater. Verdiene for disse komponentene ligger innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen, og toleranseintervallene for Pioneers referansesorter som inngikk i studien.

Fettsyresammensetning i mais

Fettsyresammensetningen for 98140 er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Søkers dokumentasjon inneholder analyser av 29 ulike fettsyrer. Av disse ble 15 ekskludert fra de statistiske analysene fordi innholdet var under deteksjonsgrensen. I henhold til søker viser kombinerte analyser over lokaliteter og år ingen signifikante forskjeller mellom den transgene linjen og kontroll for de analyserte fettsyrene. For fettsyrene som er målt ligger mengdene innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen, og toleranseintervallene for Pioneers referansesorter som inngikk i studien.

Aminosyrer i mais

Aminosyreinnholdet er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Både essensielle og ikke-essensielle aminosyrer ble analysert. I henhold til søker viser statistiske analyser over lokaliteter og år ingen signifikante forskjeller mellom den transgene linjen og kontroll for de analyserte aminosyrene. For de aminosyrene som er målt ligger mengdene innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen, og toleranseintervallene for Pioneers referansesorter som inngikk i studien.

N-acetylering av aminosyrer

In vitro studier viser at asparagin-, glutamin-, treonin-, serin- og glycinsyre N-acetyleres av GAT-enzymet (Siehl *et al.* 2005). Innholdet av N-acetyl-treonin-, -serin- og -glycinsyre i mais 98140 er noe høyere enn kontroll (se tabell 5). Mengdene ligger imidlertid innenfor eller noe over toleranseintervallet for hver aminosyre i kontroll. Innholdet av N-acetylasparagin (NAA)- og N-acetyl glutaminsyre (NAG) er henholdsvis ca. 70-400 og ca. 80-400 ganger høyere enn kontroll, se tabell 5. Det er også foretatt undersøkelser av nivåer av N-acetylasparagin- og N-acetyl glutaminsyre under forskjellige sprøytemiddelregimer. Resultater fra disse undersøkelsene viser at konsentrasjonene av disse acetylerede aminosyrene er sammenlignbare med usprøytet 98140 (se tabell 5). Det er videre foretatt analyser av forskjellige maisprodukter som kim, mel, gluten, kli m.m. Pioneer har vurdert biologisk betydning av NAA og NAG, samt foretatt eksponeringsvurderinger av disse aminosyrene fra matvareprodukter fra mais 98140. Pioneer har også sammenlignet eksponeringen av aminosyrene med det generelle inntaket fra matvarer som kylling, kyllingbuljong, egg og kjøtt. De oppgitte mengdene i disse produktene er henholdsvis fra 0,55 til 12,6 for NAA, og fra 0,05 til 160 milligram per kg råvekt for NAG. Innhold i maiskorn, kim, mel m.m. er imidlertid oppgitt som mikrogram per gram (d.s.s. milligram per kg) tørrvekt. Faggruppen finner det vanskelig å sammenligne mengdene i ulike maisprodukter og andre matvarer siden vanninnholdet ikke er kjent.

Faggruppen konkluderer imidlertid med at selv om matvarer fra mais 98140 skulle føre til økt inntak av disse N-acetylerede aminosyrene vil inntak ikke være av helsemessig betydning. Dette begrunnes med at N-deacetylaser (N-acylaser), som N-deacetylerer aminosyrer og andre N-acetylerede forbindelser, er utbredt i pattedyr, bl.a. i tarmvev og i magesekk (Uttamsingh *et al.* 2000, Arnaud *et al.* 2004).

Tabell 5. Innhold av N-acetylerede aminosyrer i maiskorn. Fra feltforsøk i USA og Canada i 2006 og 2007.

| Analytt: N-acetyl aminosyre | Kontrollmais | Mais 98140 | Kontroll for herbicid- behandlet mais | Mais 98140 behandlet med glyfosat | Mais 98140 behandlet med nico- sulfuron + rimsulfuron | Mais 98140 behandlet med nicosulfuron + rimsulfuron + glyfosat |
|-----------------------------------|---|--------------------------------|--|---|---|--|
| | Gjennomsnitt (Standard Error) Variasjonsområde (µg/g tørrvekt) | | | | | |
| NA-aspara- gin; 2006 | 0,9 (84,4) 0,098-7,32 | 403 (84,4) 103-926 | 0,789 (107) 0,098-7,32 | 393 (107) 95,4-962 | 414 (107) 108-909 | 406 (107) 96,3-992 |
| " 2007 | 4,03(23,9) 0,117-0,915 | 292(23,6) 140-479 | 4,03 (23,9) 0,117-0,915 | 268 (23,6) 162-391 | 297 (23,6) 165-470 | 283 (23,6) 175-409 |
| NA-gluta- min; 2006 | 0,5 (19) <0,075-4,04 | 79 (19) 0,62-195 | 0,958 (26,4) <0,075-4,0 | 80,6 (26,4) 0,627-175 | 94,3 (26,4) 0,663-217 | 91,0 (26,4) 0,645-221 |
| " 2007 | 0,207 (34,7) 0,0178-0,618 | 83,7 (34,7) 1,39-252 | 0,207 (34,7) 0,0178-0,618 | 86,0 (34,7) 1,43-306 | 87,1 (34,7) 1,48-302 | 90,6 (34,7) 1,17-344 |
| NA-glycin, 2006 | 0,07 0,03-0,13 | 0,23 0,11-0,37 | | | | |
| " 2007 | 0,0570(0,059) 0,0356-0,108 | 0,122 (0,0587) 0,0858-0,176 | | | | |
| NA-serin, 2006 | 0,90 0,30-1,88 | 1,97 0,73-2,87 | | | | |
| " 2007 | 0,864(0,237) 0,203-1,43 | 1,49 (0,236) 0,632-2,19 | | | | |
| NA-treonin 2006 | 0,18 0,13-0,30 | 2,99 1,77-4,42 | | | | |
| " 2007 | 0,160(0,108) 0,0818-0,289 | 1,97 (0,106) 1,33-2,93 | | | | |

N-acetylering av andre komponenter

Pioneer har foretatt undersøkelser av N-acetylering av en rekke agro-kjemikalier, som sulfuroner, captan, atrazin m.m., samt for antibiotika som kanamycin, spectomysin, ampicillin m.m. Med unntak av glyfosat er det ikke påvist N-acetylering av verken agro-kjemikalier eller antibiotika.

Vitaminer

Med unntak for vitamin C, er vitaminer målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. I henhold til dokumentasjonen fra Pioneer er det analysert for innhold av følgende parametere: B1, B2, B5, B6, niacin, folinsyre, totalmengde vitamin E, α -tokoferol, β -tokoferol, δ -tokoferol, γ -tokoferol og β -karoten. Det er ikke funnet signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll for noen av parametrene som er undersøkt. For de vitaminene som er målt ligger mengdene innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen og toleranseintervallene for Pioneers referansesorter som inngikk i studien. Vitamin C er ansett som viktige vitamin i sukkermais og står oppført i OECDs konsensusdokument.

Mineraler

Mineraler er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Det er analysert for innhold av mineralene fosfor, jern, kalium, kalsium, kobber, magnesium, mangan, natrium og sink. Det er ikke funnet statistisk signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll mht innhold av disse parametrene.

Verdiene for alle mineralene ligger innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen og de toleranseintervallene som er målt med grunnlag i maissorter fra Pioneer.

Sekundære metabolitter og antinæringsstoffer

Sekundære metabolitter og antinæringsstoffer er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. I henhold til søker viser kombinerte analyser over lokaliteter ingen signifikante forskjeller mellom den transgene linjen og kontroll for de analyserte parametrene. For samtlige komponenter ligger verdiene innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen, og toleranseintervallene for Pioneers referansesorter som inngikk i studien.

3.3. Agronomiske egenskaper

I henhold til dokumentasjon fra Pioneer er det foretatt registreringer av til sammen 13 agronomiske og morfologiske karakterer knyttet til reproduksjon, spredning, vegetativ vekst, samt resistens mot sjukdommer og skadedyr. Søker presenterer resultater fra registreringer av kvantitative karakterer som pollenkvalitet/vitalitet, frøplantevitalitet, frøavling, tidlighet, plantetetthet, plantehøyde, kolbelengde og legde. I tillegg er det gjort observasjoner av ulike kvalitative karakterer knyttet til morfologi og resistens mot sjukdommer. Dokumentasjonen fra søker inkluderer også resultater fra et feltforsøk med fire umodifiserte kommersielle maissorter. Hensikten med dette forsøket var å estimere toleranseintervaller for hver av de agronomiske karakterene som er evaluert.

Det er foretatt statistiske analyser innen og over steder innen hvert forsøksår, der umodifisert kontroll ble sammenlignet med testlinjen 98140 uten herbicidbehandling, og sprøytet med henholdsvis glyfosat, ALS-herbicidene nicosulfuron og rimsulfuron, eller både glyfosat, nicosulfuron og rimsulfuron. Variansanalyse over forsøkssteder viste ingen signifikante forskjeller ($p \geq 0,05$) mellom 98140 og kontroll for de observerte karakterene, verken i 2006 eller 2007. Disse resultatene var uavhengige av herbicidregime. Statistiske analyser innen lokaliteter viste signifikante forskjeller ($p \leq 0,05$) for tidlighet målt som tidspunkt for pollenspredning og modning av hunnblomster på 1 til 2 lokaliteter i 2006.

3.4. Delkonklusjon

Med unntak for vitamin C, er analysene av ernæringsmessige komponenter utført i tråd med OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002). Faggruppen understreker at konsensusdokumentet i størst mulig grad skal følges når det legges fram dokumentasjon på nivåene av næringsstoffer, antinæringsstoffer og metabolitter.

Vitamin C er ansett som et viktig vitamin i sukkermais, men faggruppen vektlegger at hoveddelen av maisforbruket i Norge er som dyrefôr, og at mais til humant konsum utgjør mindre enn 1 % av energiinntaket både for voksne og barn under ett år. Når det gjelder dyrefôr ansees det naturlige vitamininnholdet i mais å være uten betydning da all mais som benyttes som fôr vitaminberikes i henhold til Mattilsynets anbefalinger. Tilsvarende angis krav til ernæringsmessig sammensetning av kornbasert barnemat i vedlegg 1 i Forskrift om bearbeidet kornbasert barnemat og annen barnemat til spedbarn og småbarn (FOR 2002-10-18 nr 1185). Faggruppen vurderer derfor at et eventuelt avvikende vitaminnivå i 98140 har liten ernæringsmessig betydning i Norge.

Det er påvist signifikante forskjeller mellom maislinje 98140 og kontroll i enkeltparametere. Verdiene for de analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen, samt innenfor toleranseintervallene for de umodifiserte referansesortene som er inkludert i søkers dokumentasjon.

Søker har foretatt analyser av N-acetylering av agrokjemikalier, antibiotika og aminosyrer. Det er ikke påvist N-acetylering av verken agrokjemikalier eller antibiotika, men det er påvist N-acetylering av noen aminosyrer. Faggruppen konkluderer med at selv om matvarer fra mais 98140 skulle føre til økt

inntak av disse N-acetylerede aminosyrene, vil inntaket ikke være av helsemessig betydning. Dette begrunnes med at N-deacetylasen (N-acylase), som N-deacetylerer aminosyrer og andre N-acetylerede forbindelser, er utbredt i pattedyr, bl.a. i tarmvev og i magesekk.

Med unntak av herbicidtoleranse, viser feltforsøk i USA og Canada ingen signifikante forskjeller mellom den transgene maishybriden 98140 og kontrollinjer med hensyn på agronomiske og morfologiske karakterer.

4. Dokumentasjon av toksisitet og allergisitet

4.1. Toksisitet

Akutt oral føringstudie på mus

I 2005 og 2006 utførte Pioneer akutt oral føringstudier på 9 ukers gamle mus med renfremstilt GAT4621 (Study PHI-2005-110) og ZM-HRA (Study PHI-2006-009), produsert av *E. coli*. Studiene ble utført i henhold til GLP-retningslinjene fra EPA (40 CFR Part 160, 1989), og OECD Good Laboratory Practices. I studiene ble det benyttet 5 hann- og 5 hunnmus (stamme CrI:CD[®]-1(ICR)BR). Som proteinkontroll ble det benyttet serumalbumin.

GAT4621

Mengde GAT4621-protein (>95 % renhet) og bovint serumalbumindosen var 2000 mg/kg kroppsvekt ved akutt oral føringstudien. Etter 14-dagers observasjonsperiode ble alle dyrene avlivet, og det ble utført grov-patologiske undersøkelser. Søker dokumenterer ikke hvilke organer som er undersøkt. Det ble ikke påvist testrelaterte skader på forsøksdyrene.

ZM-HRA

Mengde ZM-HRA-protein (82,4 % renhet) og serumalbumindosen var 2000 mg/kg kroppsvekt ved akutt oral føringstudier. Omregnet til rent ZM-HRA-protein er dosen 1648 mg/kg kroppsvekt. Etter 14-dagers observasjonsperiode ble alle dyrene avlivet. Det er utført grov patologiske undersøkelser, men søker dokumenterer ikke hvilke organer som er undersøkt. Det ble ikke påvist testrelaterte skader på dyrene.

Det bemerkes at i følge Technical dossier er faktisk dose ZM-HRA 582 mg/kg, dvs. det samme ble dosert i soya-dokumentet. I vedlegg (appendix) 21 i 98140-dokumentasjonen er faktisk dose oppgitt til 1648 mg/kg.

Føringforsøk på mus

Søker har ikke foretatt 28-dagers føringforsøk på mus med renfremstilt GAT4621- eller ZM-HRA-protein. Ifølge Pioneer er dette unødvendig siden det er foretatt 90-dagers føringforsøk med rotter. I tillegg anfører søker at GAT4621- og ZM-HRA-enzymene er svært like GAT4601- og GM-HRA-enzymene, som tidligere er undersøkt i soyalinjen 356043 (søknad EFSA/GMO/UK/2007/43). I søknaden EFSA/GMO/UK/2007/43 er det dokumentert 28-dagers føringforsøk på mus med renfremstilt GAT4601- og GM-HRA-protein.

Føringforsøk på broiler

Søknaden inneholder dokumentasjon fra et 42-dagers føringforsøk (Study PHI-2006-185) med hann- og hunnbroilere (Ross x Cobb) (n = 120/group, 50 % hann- and 50 % hunn fugler) i 42 dager. Studien (PHI-2006-185) ble utført i henhold til prinsippene for OECDs Good Laboratory Practices ENV/MC/CHEM(98)17 og U.S. EPA FIFRA (40 CFR part 160) Good Laboratory Practice Standards. Forsøket omfattet 720 dyr, fordelt på seks grupper à 120 dyr. Dyrene ble føret med maismel fra henholdsvis 98140, 98140 sprøytet med glyfosat/nicosulfuron/rimsulfuron (98140+Gly/SU), en umodifisert kontrollsort (091) og tre kommersielle umodifiserte referansesorter (33J56, 33P66, 33R77). Føret ble undersøkt for en rekke ernæringsmessige komponenter, mykotoksiner, mineraler, samt konsentrasjon av GAT4621- og ZM-HRA-protein. Det ble også analysert for innhold av N-

acetyl-L-aspartat (NAAsp) og N-acetyl-L-glutamat (NAGlu). Mengde NAAsp og NAGlu i kontrollfôr og referansefôr var henholdsvis 0,032 - 0,705 µg/g og 0,17-0,43 µg/g. I 98140 var mengdene henholdsvis 132-366 µg/g og 49-81 µg/g. Startfôret (dag 0-21) inneholdt 58,5 % mais, vekstfasefôr (dag 22-35) inneholdt 64 % mais, og fôr for slutfôringsfasen (dag 36-42) inneholdt 71,5 % mais (likt for alle gruppene). Følgende parameter ble undersøkt: mortalitet, vektøkning, føreffektivitet, skrott, bryst, lår, vinger, abdominalt fett, nyre og lever (% av kroppsvekt til levende broilere). Det ble ikke påvist statistisk signifikante endringer i de målte parametrene ved fôring med mais fra 98140, 98140+Gly/SU, sammenlignet med kontroll og referansesorter.

Subkronisk fôringsforsøk på rotter

Det ble utført et 13 ukers fôringsforsøk (Study PHI-2006-176) med hann- og hunnrotter (stamme CrI:CD(SD)), 6 grupper á 12 rotter/kjønn. Studien (PHI-2006-176) ble utført i henhold til prinsippene til OECD guideline reference 408 (1998): Repeated dose 90 day oral toxicity study in rodents, United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA), Health Effects Test Guidelines, OPPTS. 870.3100 (August 1998): 90-Day Oral Toxicity in Rodents og Commission Directive 2001/59/EC, Part B.26, *Methods for the Determination of Toxicity* (2001), samt OECDs Good Laboratory Practices og U.S. EPA FIFRA (40 CFR part 160) Good Laboratory Practice Standards.

Rottene var 7 uker gamle ved starten av fôringsforsøket. Gjennomsnittlig vekt ble oppgitt til henholdsvis 230 g for hanner og 168 g for hunner, med variasjonsområde ± 20 % innenfor hvert kjønn. Fôret bestod av 36,18 % vekt/vekt maiskorn fra henholdsvis ubehandlet og 37,21 % glyfosat/nicosulfuron/rimsulfuron (98140+Gly/SU) behandlet 98140 planter, samt maiskorn fra nær-isogenetisk mais 091 og referansesortene 33J56, 33P66 og 33R77. Videre opplyses det at tilsatt mengde maiskorn for kontrollene var 37,25 % (091), 37,45 % (33J56), 37,51 (33P66) og 35,54 (33R77). Fôret ble undersøkt for en rekke komponenter, se tabell 6.

Tabell 6. Oversikt over analyserte komponenter i fôr benyttet i subkronisk fôringsforsøk på rotter.

SUMMARY OF ANALYTES MEASURED

| Analyte | Measured in | |
|---|-------------|------|
| | Grain | Diet |
| proximates (crude protein, crude fat, carbohydrate, ash) | X | X |
| moisture and dry matter | X | X |
| fiber (crude, ADF, NDF) | X | X |
| gross energy | | X |
| amino acids (essential and non-essential) | X | X |
| minerals (Ca, P, Mg, K, Fe, Zn, Na, Cu, Mn, Se) | X | X |
| minerals (Co, Cl, I, Cr, F) | | X |
| heavy metals (As, Cd, Pb, Hg) | | X |
| vitamin E (as α-tocopherol), β-, γ-, δ-, and total tocopherol | X | X |
| vitamins (B1, B2, B6, folic acid, niacin, pantothenic acid, B-carotene) | X | X |
| vitamins (B12, A, D3, biotin, choline) | | X |
| fatty acids (palmitic, stearic, oleic, linoleic, linolenic, arachidic, gadoleic, behenic; others if quantifiable) | X | |
| trypsin inhibitor activity | X | |
| phytic acid, inositol, raffinose, furfural, phenolic acids | X | |
| mycotoxin panel | X | X |
| pesticide residue panel | X | X |
| molecular event detection (DP-09814 Ø -6) | X | |
| protein detection by ELISA (GAT4621 and ZM-HRA) | X | X |

Det ble utført makroskopiske og mikroskopiske undersøkelser av organene, samt klinisk patologisk undersøkelser, kjemisk og hematologisk undersøkelse av blod fra alle dyrene i hver gruppe (tabell 7).

Tabell 7. Oversikt over parametere som er undersøkt i subkronisk fôringsforsøk på rotter.

| Study Parameters | Frequency |
|----------------------------------|--|
| Body Weight | Daily for Week 1, then weekly thereafter |
| Food Consumption | Daily for Week 1, then weekly thereafter |
| Detailed Clinical Observations | Day 0 and weekly thereafter |
| Daily Animal Health Observations | Twice daily |
| Ophthalmology Evaluation | Pretest and Week 13 |
| Neurobehavioral Evaluation | Pretest and approximately Week 13 |
| Clinical Pathology Evaluation | Approximately Week 14 |
| Necropsy | Week 14 |

Tabell 8. Oversikt over analyser foretatt for sammenligning innenfor og mellom gruppene i subkronisk fôringsforsøk på rotter.

| Parameter | Preliminary Test | Method of Statistical Analysis | |
|---|--|--|--|
| | | If preliminary test is not significant | If preliminary test is significant |
| Body Weight Body Weight Gain Food Consumption Food Efficiency Organ Weight Clinical Pathology ^a | Levene's test for homogeneity ⁽⁸⁾ and Shapiro-Wilk test ⁽⁹⁾ for normality | One-way analysis of variance ⁽¹⁰⁾ followed by linear contrasts ⁽¹¹⁾ | Dunn's Type 1 test for linear contrasts ⁽¹²⁾ |
| Motor Activity ^b Grip Strength | Levene's test for homogeneity ⁽⁸⁾ and Shapiro-Wilk test ⁽⁹⁾ for normality ^b | Repeated measures analysis of variance ⁽¹³⁾ followed by contrasts ⁽¹⁴⁾ | A normalizing, variance stabilizing transformation or non-parametric test (Dunn's) ⁽¹²⁾ |
| Survival Incidence of FOB Descriptive Parameters | None | Fisher's Exact test ⁽¹⁵⁾ with a Bonferroni-Holm correction ⁽¹⁶⁾ | |

a When an individual observation was recorded as being less than a certain value, calculations were performed on half the recorded value. For example, if bilirubin was reported as <0.1, 0.05 was used for any calculations performed with that bilirubin data.

b Test day and 10-minute intervals were used as repeated-measure factors.

Fôranalyser viser at innholdet av ernæringsmessige komponenter, sekundære plantemetabolitter, antinæringsstoffer og mineraler de forskjellige fôrgruppene var sammenlignbare. Det ble påvist lave konsentrasjoner av fumonisin B1 og moniliformin i alle maiskorn, mens deoxynivalenol ble påvist i kontroll (091) og referansesortene. Videre ble det påvist fumonisin B2 i korn fra 98140. Mengdene av disse mykotoksinene var lavere enn det som antas å kunne påvirke dyrehelse.

Det ble ikke påvist statistisk signifikante endringer i de undersøkte parametrene. I henhold til søker ble det ikke påvist signifikante forskjeller i hematologiske parametre. Klinisk kjemiske parametre sammenlignet med kontroll viste økt gjennomsnittlig mengde alkaliskfosfatase (ALKF) ved testdag 92-96 hos hannrotter føret med ubehandlet mais 98140, og dag 97-99 hos hunnrotter føret med 98140 + Gly/SU. Forhøyet verdier av ALKF i blod kan tyde på skader i lever-gallesystemet og sykdom i skjelettet. Ved lever- og galleveisskade er de viktigste endringene økt levervekt samt hepatocellulær hypertrofi og økt mengde serumbilirubin, samt skader i gallegangen. Undersøkelser av lever-gallesystemet viser ingen endringer som tyder på skader som påvises ved store endringer i ALKF. De påviste endringene i ALKF er ikke doserelatert, samt er kun begrenset til et kjønn. Det er heller ikke påvist endringer som kan tilskrives herbicidbehandling. De forskjellene som ble påvist ble av søker ikke betraktet som toksikologiske relevante fordi forskjellene kun er påvist i en enkelt fôrgruppe (forskjellig fôrgruppe for hann- og hunddyr). For de andre fôrgruppene for hann- og hunddyr er det ikke påvist forskjeller i ALKF-mengdene.

4.2. Allergenitet

Undersøkelser av allergent potensiale av GAT4621 og ZM-HRA er utført i henhold til anbefalinger fra Codex (2003) og FAO/WHO (2000, 2001). Sammenligning av et proteins aminosyresekvens med aminosyresekvensen til et kjent allergent protein er en nyttig indikator på allergent potensiale. Aminosyresekvensen til de fleste viktige allergener, deriblant matallergener, er kjent. De viktige IgE-bindingsepitopene, dvs. aminosyresekvenser på 8-12 aminosyrer (noen ganger færre) der IgE binder seg, er kartlagt for mange allergener. Eksakt konservering av epitopesequenser er påvist mellom homologe allergener i forskjellige arter. Aminosyresekvensene til 1251 antatte og påviste mat-, miljø- og kontaktallergener samt proteiner som fører til cøliaki har blitt sammenlignet med sekvenser med GAT4621- og ZM-HRA-proteinene. Det ble ikke funnet noen signifikant sekvenshomologi på 8 eller større aminosyresekvenser med de allergene proteinene. Det ble heller ikke påvist aminosyresekvenser i GAT4621- og ZM-HRA-proteinene som ligner på kjente allergene epitoper.

Allergene proteiner i mat er ofte varme- og syrestabile. Matallergenene er oftest, men ikke alltid, stabile overfor mage- og tarmsafter. Allergene matproteiner er ofte de proteinene som forekommer i størst mengde i matvarer. Typiske mengder er fra 1-80 % av proteininnholdet. Konsentrasjonen av GAT4621- og ZM-HRA -protein i korn er ca 0,01 % av totalt protein, og utgjør således en svært liten del av det totale proteininnholdet. GAT4621- og ZM-HRA-protein er testet i simulert mage- og tarmsaft, og proteinene brytes ned i løpet av ca. 30 sekunder. Det antas derfor at proteinet også brytes raskt ned i menneskets mage- og tarmkanal. Det er heller ikke blitt vist at N-acetyltransferase- og acetolaktatsyntase-proteiner i forskjellige matplanter og mikroorganismer som er nevnt ovenfor, er allergene.

Basert på de testene som er omtalt, dvs. at GAT4621- og ZM-HRA -proteinene ikke har noen aminosyresekvenser som har likhet med allergene proteiners epitoper, at proteinet brytes raskt ned av mage-tarmsafter, at andel av totalt proteininnhold er ca 0,01 %, og at N-acetyltransferase- og acetolaktatsyntase-proteiner sannsynligvis bestandig har vært en del av menneskets kost, anser faggruppen det som lite trolig at GAT4621- og ZM-HRA-protein har større potensiale for å gi utvikling av matallergi hos mennesker enn det som umodifisert mais har.

Faggruppen konkluderer med at GAT4621- og ZM-HRA-proteinene sannsynligvis ikke er mer allergent eller toksisk enn villtype N-acetyltransferase- og acetolaktatsyntaseproteiner.

4.3. Delkonklusjon

Innholdet av GAT4621- og ZM-HRA-proteinene i korn er ca 0,01 % av totalt protein, og utgjør således en svært liten del av det totale proteininnholdet. Proteinene viser ikke homologi til allergener eller toksiner, og de degraderes hurtig i simulert mage- og tarmsaft. Da N-acetyltransferaser (GAT)- og acetolaktatsyntase (HRA)-proteiner sannsynligvis bestandig har vært en del av menneskets kost, anser faggruppen det som lite trolig at GAT4621- og ZM-HRA-protein har større potensiale for å gi utvikling av matallergi eller toksiske effekter hos mennesker enn det som umodifisert mais har. Faggruppen konkluderer derfor med at GAT4621- og ZM-HRA-proteinene sannsynligvis ikke er mer allergent eller toksisk enn villtype N-acetyltransferase- og acetolaktatsyntaseproteiner.

Faggruppen finner det også lite sannsynlig at eksponering av GAT4621- og ZM-HRA -proteinene i seg selv og i de mengder som tilføres via genmodifisert mais er helsemessig betenkelig. Føringstudier på rotter viser ingen skadelige helseeffekter. Videre konkluderer ernæringsstudier med broilere at maislinjen 98140 er ernæringsmessig lik umodifisert mais. Faggruppen konkluderer derfor med at 98140 brukt som mat og fôrvarer ikke medfører endret helserisiko i forhold til annen mais.

5. Miljørisikovurdering

Pioneers søknad om godkjenning av maislinjen 98140 under EU forordning 1829/2003/EF omfatter bruksområdene fôrvarer, næringsmidler, import og prosessering. Søknaden gjelder ikke dyrking. Miljørisikovurderingen av de transgene maislinjene er derfor avgrenset til mulige effekter av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport og prosessering til mat, fôr og ulike industrielle formål. I tillegg vil indirekte eksponering gjennom gjødsel fra husdyr føret med genmodifisert mais representere en mulig kilde til uønsket genspredning.

5.1. Potensiale for utilsiktede effekter på fitness relatert til genmodifiseringen

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

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

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

Spredning av mais til andre habitater i Europa er hovedsakelig begrenset av dårlig konkurranseevne, manglende frøkvile, mottagelighet for sykdom og liten toleranse for lave temperaturer. Det er ikke påvist forskjeller mellom den herbicidtolerante maislinjen og konvensjonelle sorter med tilsvarende genetisk bakgrunn for disse karakterene, og det er ikke grunn til å anta at den introduserte egenskapen hos mais 98140 vil medføre økt fitness utenfor dyrkingsmiljø i forhold til konvensjonelle maissorter.

5.2. Potensiale for genoverføring

En forutsetning for genspredning er tilgjengelige veier for overføring av genetisk materiale, enten via horisontal genoverføring av DNA, eller vertikal genflyt i form av frøspredning og krysspollinering. Eksponering av mikroorganismer for rekombinant DNA skjer under nedbryting av plantemateriale på dyrket mark og/eller pollen i åkrer og omkringliggende arealer. Rekombinant DNA er også en komponent i en rekke mat- og fôrprodukter, som er avledet av plantemateriale fra den transgene sorten. Dette medfører at mikroorganismer i fordøyelseskanalen hos mennesker og dyr kan eksponeres for rekombinant DNA. Siden mais ikke har viltvoksende populasjoner eller nærstående arter utenfor dyrking i Europa, vil vertikal genoverføring være knyttet til krysspollinering med konvensjonelle og eventuelle økologiske sorter.

5.2.1 Horisontal genoverføring

Data fra tilgjengelige eksperimentelle studier viser at genoverføring fra transgene planter til bakterier etter all sannsynlighet inntreffer svært sjelden under naturlige forhold, og at denne overføringen forutsetter sekvenshomologi mellom overført DNA og bakterien (EFSA 2004; VKM 2005).

Ut fra dagens vitenskapelig innsikt med hensyn til barrierer for genoverføring mellom ubeslektede arter og flere års forskning for om mulig å framprovosere tilfeldig overføring av genetisk materiale fra planter til mikroorganismer er det lite som tyder på at transgenene i 98140 skal kunne overføres til andre enn naturens kryssingspartnere ved detekterbare frekvenser i laboratoriestudier. Det er gjort forsøk som ser på stabilitet og opptak av DNA fra tarmkanalen hvor mus er oralt tilført M13 DNA. Det tilførte DNAet var sporbart i avføring opp til syv timer etter fôring. Svært små mengder av M13 DNA (<0.1 %) kunne spores i blodbanene i en periode på maksimum 24 timer, mens M13 DNA ble funnet i opptil 24 timer i lever og milt (Schubbert *et al.* 1994). Ved oralt inntak av genmodifisert soya er det vist at DNA er mer stabilt i tarmen hos personer med utlagt tarm sammenlignet med kontrollgruppen (Netherwood *et al.* 2004). I kontrollgruppen ble det ikke påvist GM DNA i feces. Nielsen *et al.* (2000) og De Vries & Wackernagel (2002) har undersøkt persistens av DNA og opptak av GM DNA i jord. I disse laboratorieforsøkene ble det påvist svært små mengder DNA som var overført fra planter til bakterier. Forutsetningen for at dette kunne skje var sekvenshomologi mellom plantetransgenet og mottagerbakterien. I hvilken grad det forekommer tilfeldig sekvenshomologi mellom plantetransgener og naturlig forekommende bakterier er usikkert, men siden de fleste transgenene inneholder rekombinerte DNA sekvenser fra jordbakterier kan dette ikke utelukkes (Bensasson *et al.* 2004)

Med bakgrunn i opprinnelse og karakter/egenskaper av de innsatte genene og mangel på seleksjonspress i fordøyelseskanal og/eller miljøet, er sannsynligheten for at horisontal genoverføring vil gi selektive fordeler eller økt fitness på mikroorganismer svært liten (Nielsen 2003). Det er derfor usannsynlig at gener fra 98140 vil etableres stabilt i genomet til mikroorganismer i miljøet eller i fordøyelseskanalen hos mennesker eller dyr. Ut fra tilgjengelig kunnskap er det ikke grunn til å forvente at det vil skje horisontal genoverføring av DNA-materiale fra maislinje 98140.

5.2.2 Vertikal genoverføring

Potensialet for krysspollinering mellom maislinje 98140 og konvensjonelt foredlete maissorter vil avhenge av omfanget av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport, håndtering og prosessering. Det er imidlertid lite sannsynlig at sporadiske enkeltplanter vil spre signifikante mengder pollen til konvensjonelle dyrkingsfelt. Dyrkingsomfanget av mais i Norge er dessuten svært begrenset. Risiko for utkryssing med dyrkede sorter vurderes derfor til å være ubetydelig.

Herbicidtoleranse vil ikke representere noen selektiv fordel og økt sannsynlighet for spredning av mais i Europa. Overlevelse hos mais er i hovedsak begrenset av dårlig konkurransevne, manglende frøkvile, mottagelighet for soppsjukdommer og liten frosttoleranse. Som for konvensjonelle sorter er det ingenting som tilsier at eventuelle spillplanter vil overleve til neste vekstsesong eller etablere uønskede populasjoner.

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

5.3. Overvåking

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

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

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

Søknad EFSA/GMO/UK/2008/53 omfatter ikke dyrking, og potensiell miljøeksponering av den transgene maislinjen er derfor avgrenset til mulige effekter av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport og prosessering til mat, fôr og industrielle formål. I tillegg vil indirekte eksponering gjennom gjødsel fra husdyr fôret med genmodifisert mais representere en mulig kilde til uønsket genspredning. Miljørisikovurderingen som er presentert av søker identifiserer ingen endret risiko for miljø i forhold til annen mais. Syngenta har derfor ikke utarbeidet spesifikke strategier for risikohåndtering eller en særskilt plan for overvåking av 98140.

Tatt i betraktning tiltenkt bruksområde for 98140 anser Faggruppe for GMO at det ikke er behov for å iverksette særskilt program for overvåking av maislinjen.

5.4. Delkonklusjon

Søknaden gjelder godkjenning av maislinjen 98140 for import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av maislinjen. Med bakgrunn i tiltenkt bruksområde er miljørisikovurderingen avgrenset til mulige effekter av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport og prosessering, samt indirekte eksponering gjennom gjødsel fra husdyr fôret med genmodifisert mais.

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

6. Vurdering av søkers dokumentasjon

Faggruppe for genmodifiserte organismer ser det som positivt at dokumentasjonen knyttet til søknaden EFSA/GMO/UK/2008/53 ikke inneholder deler som er unndratt offentlighet. Dette i motsetning til det som er praksis hos andre søkere, der betydelige andeler av dokumentasjonen er klassifisert som konfidensiell.

Faggruppen påpeker også at det mangler analyser av C-vitamin, en av komponentene som OECDs konsensusdokument for mais anbefaler analysert.

FG3s innspill til EFSA-nett 12.02.09 til søknad EFSA/GMO/UK/2008/53

D. 07.03

Selection of compounds for analysis

The GMO panel of The Norwegian Scientific Committee for Food Safety (FG3) is of the opinion that key nutrients and the various components listed in the OECD consensus document should be analysed and that their levels should be determined accordingly. If the applicant does not provide the

information according to the specifications provided by the OECD, this should be further justified and explained. In relation to the EFSA/GMO/UK/2008/53 notification the Norwegian GMO panel asks for the reason why data on vitamin C is still lacking. For most consumers benefiting from a balanced diet this is probably of minor importance, for vulnerable individuals however (e.g. babies or individuals in developing countries), with a diet consisting predominantly of maize, this may be more relevant.

In the Technical Dossier in Table 14a the range of NAG is about 10^{-3} smaller than the other ranges. Why?

D, 07.08 Toxicology

Acute oral mouse toxicity assessment.

On page 40 in the Technical Dossier it is stated that the dose of ZM-HRA protein is 582 mg/kg. In Annex 21, ZM-HRA: Acute oral toxicity study in mice (PHI-2006-009), the dose of ZM-HRA protein is 2000 mg/kg, corresponding to 1648 mg ZM-HRA protein/kg body weight. Which dose is correct?

KONKLUSJON

Med unntak for vitamin C, er analysene av ernæringsmessige komponenter utført i tråd med OECDs konsensudokument for mais (OECD 2002). Faggruppe for genmodifiserte organismer understreker at konsensudokumentet i størst mulig grad skal følges når det legges fram dokumentasjon på nivåene av næringsstoffer, antinæringsstoffer og metabolitter.

Vitamin C er ansett som et viktig vitamin i sukkermais, men faggruppen vektlegger at hoveddelen av maisforbruket i Norge er som dyrefôr, og at mais til humant konsum utgjør mindre enn 1 % av energiinntaket både for voksne og barn under ett år. Når det gjelder dyrefôr ansees det naturlige vitamininnholdet i mais å være uten betydning da all mais som benyttes som fôr vitaminberikes i henhold til Mattilsynets anbefalinger. Tilsvarende angis krav til ernæringsmessig sammensetning av kornbasert barnemat i vedlegg 1 i Forskrift om bearbeidet kornbasert barnemat og annen barnemat til spedbarn og småbarn (FOR 2002-10-18 nr 1185). Faggruppen vurderer derfor at et eventuelt avvikende vitaminnivå i 98140 har liten ernæringsmessig betydning i Norge.

Det er påvist signifikante forskjeller mellom maislinje 98140 og kontroll i enkeltparametere. Verdiene for de analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen, samt innenfor toleranseintervallene for de umodifiserte referansesortene som er inkludert i søkers dokumentasjon.

Søker har foretatt analyser av N-acetylering av agrokjemikalier, antibiotika og aminosyrer. Det er ikke påvist N-acetylering av verken agrokjemikalier eller antibiotika, men det er påvist N-acetylering av noen aminosyrer. Faggruppen konkluderer med at selv om matvarer fra mais 98140 skulle føre til økt inntak av disse N-acetylerede aminosyrene vil inntaket ikke være av helsemessig betydning. Dette begrunnes med at N-deacetylasen (N-acylaser), som N-deacetylerer aminosyrer og andre N-acetylerede forbindelser, er utbredt i pattedyr, bl.a. i tarmvev og i magesekk.

Innholdet av GAT4621- og ZM-HRA-proteinene i korn er ca 0,01 % av totalt protein, og utgjør således en svært liten del av det totale proteininnholdet. Proteinene viser ikke homologi til allergener eller toksiner, og de degraderes hurtig i simulert mage- og tarmsaft. Da N-acetyltransferaser (GAT)- og acetolaktatsyntase (HRA)-proteiner sannsynligvis bestandig har vært en del av menneskets kost, anser faggruppen det som lite trolig at GAT4621- og ZM-HRA-protein har større potensiale for å gi utvikling av matallergi eller toksiske effekter hos mennesker enn det som umodifisert mais har. Faggruppen konkluderer derfor med at GAT4621- og ZM-HRA-proteinet sannsynligvis ikke er mer allergent eller toksisk enn villtype N-acetyltransferase- og acetolaktatsyntaseproteiner.

Faggruppen finner det også lite sannsynlig at eksponering av GAT4621- og ZM-HRA -proteinene i seg selv og i de mengder som tilføres via genmodifisert mais er helsemessig betenkelig. Føringstudier på rotter viser ingen skadelige helseeffekter. Videre konkluderer ernæringsstudier med broilere at maislinjen 98140 er ernæringsmessig lik umodifisert mais. Faggruppen konkluderer derfor med at 98140 brukt som mat og fôrvarer ikke medfører endret helserisiko i forhold til annen mais.

Faggruppen har ikke vurdert problematikken knyttet til eventuelle rester av glyfosat, AMPA, tifensulfuron, klorimuron eller nedbrytingsprodukter i mat- og fôrprodukter av 98140. Faggruppen legger imidlertid til grunn at produkter, der verdiene ligger under grenseverdiene for akseptabelt daglig inntak, ikke innebærer endret helserisiko i forhold til annen mais.

Med unntak for herbicidtoleranse viser feltforsøk ingen signifikante forskjeller mellom den transgene maishybriden 98140 og kontrollinjer med hensyn på agronomiske og morfologiske karakterer.

Søknaden gjelder godkjenning av maislinjen 98140 for import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking

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

Samlet vurdering

Faggruppe for genmodifiserte organismer finner det lite trolig at den omsøkte bruken av maislinje 98140 vil medføre endret risiko for helse og miljø i forhold til annen mais.

REFERANSER

- Agbios (2009). Agbios GM Database. Information on GM Approved Products.
<http://www.agbios.com/dbase.php>
- Arnaud, A., Ramírez, M., Baxter J.H. & Antonio J. Anguloa, A.J. (2004) Absorption of enterally administered N-acetyl- -glutamine versus glutamine in pigs. *Clinical Nutrition*, **23**, 1303-1312.
- Bensasson, D., Boore, J.L. & Nielsen, K.M. (2004). Genes without frontiers. *Heredity*, **92**, 483-489.
- Codex (2003). Codex Alimentarius Commission, Alinorm 03/34: Joint FAO/WHO Food Standard Programme, Codex Alimentarius Commission, Twenty-Fifth Session, Rome, Italy, 30 June-5 July, 2003.
- de Vries, J. & Wackernagel, W. (2002). Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **99**, 2094-2099.
- EFSA (2004). Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. *The EFSA Journal*, **48**, 1-18. http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_opinions/384.html
- EFSA (2006). *Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed*. 100 s. http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_guidance/660.html
- FAO/WHO (2000). Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- FAO/WHO (2001). *Evaluation of allergenicity of genetically modified foods*. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on foods derived from biotechnology. 22-25 January 2001. Rome: Food and Agriculture Organisation of the United Nations (<http://www.fao.org/es/esn/gm/allergygm.pdf>)
- Hallauer, A.R. (2000). Potential for outcrossing and weediness of genetically modified insect protected corn. APHIS-USDA.
- Lid, J. & Lid, D.T. (2005). Norsk flora. Det Norske Samlaget, Oslo. 7. utgave. ISBN: 82-521-6029-8. 1230s.
- Netherwood, T., Martín-Orúe, S.M., O'Donnell, A.G., Gockling, S., Graham, J., Mathers, J.C. & Gilbert, H.J. (2004). Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nature Biotechnology*, **22**, 204-209.
- Nielsen, K.M., van Elsas, J.D. & Smalla, K. (2000). Transformation of *Acinetobacter* sp. 13(pFG4deltanptII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Applied Environmental Microbiology*, **66**, 1237-42.
- Nielsen, K.M. (2003). An assessment of factors affecting the likelihood of horizontal transfer of recombinant plant DNA to bacterial recipients in the soil and rhizosphere. *Collection of Biosafety Reviews*, **1**, 96-149.

- OECD (2002). Consensus Document on Compositional Consideration for New Varieties of Maize (*Zea Mays*): key Food and Feed Nutrients, Anti-nutrients and Secondary Plant Metabolites, No. 6, series on Safety of Novel Foods and Feeds.
- OECD (2003). Consensus Document on the biology of *Zea mays* subsp. *Mays* (Maize). *Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology (ENV/JM/MONO, No. 27*, 1-49.
- Schubbert, G.W., Lettmann, C. & Doerfler, W. (1994). Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Molecular & general Genetics*, **242**, 495-504.
- Siehl, D.L., Castle, L.A., Gorton, R., Chen, Y.H., Bertain, S., Cho, H-J., Keenan, R., Liu, D. & Lassner, M.W. (2005). Evolution of a microbial acetyltransferase for modification of glyphosate: a novel tolerance strategy. *Pest Management Science*, **61**, 235-240.
- TemaNord (1998). *Safety Assessment of Novel Food Plants: Chemical Analytical Approaches to the Determination of Substantial Equivalence*. TemaNord 1998:591. ISBN 92-893-0263-1.
- Uttamsingh, V., Baggs, R. B., Krenitsky, D. M. & Anders M. W. (2000) Immunohistochemical localization of the acylases that catalyze the deacetylation of n-acetyl-l-cysteine and haloalkene-derived mercapturates. *Drug Metab. Dispos.* **28** (6), 625-632.
- VKM (2005). *Report from an Ad Hoc Group appointed by the Norwegian Scientific Panel on Genetically Modified Organisms and Panel on Biological Hazards – An assessment on potentially long-term health effects caused by antibiotic resistance marker genes in genetically modified organisms based on antibiotic usage and resistance patterns in Norway*. Opinion 05/302-1-final. Norwegian Scientific Committee for Food Safety, Oslo, Norway. 62 p.