



**Helse- og miljørisikovurdering  
genmodifisert mais MON 87460  
fra  
Monsanto  
(EFSA/GMO/NL/2009/70)**

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

**4. mai 2010**

**ISBN: 978-82-8082-406-6**

**VKM Report 2010: 16**

## **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:

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

### Koordinatorer fra sekretariatet:

Arne Mikalsen og Merethe Aasmo Finne

## SAMMENDRAG

Helse- og miljørisikovurderingen av den maislinjen MON 87460 (EFSA/GMO/NL/2009/70) fra Monsanto er utført av Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM). Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning (DN) ber Vitenskapskomiteen for mattrygghet om å vurdere den genmodifiserte maislinjen MON 87460 til import og prosessering, og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Søknaden gjelder ikke dyrking.

Risikovurderingen av den genmodifiserte maisen er basert på dokumentasjonen som er gjort tilgjengelig på EFSAAs nettside EFSA GMO Extranet. I tillegg er det benyttet informasjon fra uavhengige vitenskapelige publikasjoner i vurderingen. MON 87460 er risikovurdert i henhold til tiltenkt bruk i EU/EØS-området, 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 er ikke vurdert av faggruppen. Videre er EFSAAs retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter (EFSA 2006) og Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) konsensusdokument for mais (OECD 2002) lagt til grunn for vurderingen.

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

Maislinje MON 87460 er fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformasjon av embryogent vev fra den konvensjonelle maislinjen LH59. MON 87460-plantene har fått satt inn et rekombinant DNA-fragment med to genekspresjonskassetter, inneholdende genene *cspB* og *nptII*. *CspB* er et modifisert bakterielt gen fra *Bacillus subtilis*, som gir plantene økt tørketoleranse. Antibiotikaresistensmarkørgenet *nptII*, som stammer fra bakterien *E. coli*, gir plantene resistens mot aminoglykosider som kanamycin og neomycin. Genet er introdusert som seleksjonsmarkør for identifikasjon av transformanter under regenerasjonen.

### Komparative analyser

Analyser av ernæringsmessige komponenter er i hovedsak utført i tråd med OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002). Det er påvist signifikante forskjeller mellom maislinje MON 87460 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.

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

*Faggruppen vektlegger at hoveddelen av maisforbruket i Norge er som dyrefôr og at mais til humant konsum utgjør mindre enn 1 % av energiinntaket både for voksne og barn under ett år. Daglig inntak av sukkermais vil bidra med henholdsvis 0,1 % og 0,5 % av daglig anbefaling for vitamin A og C ved inntak lik medianen (data fra Den Norske mor barn studien). Ved maisinntak på 17,5 g/dag (97,5 % persentilen) for ungdom over 13 år vil om lag 2,1 % og 2,6 % av daglig anbefaling for henholdsvis vitamin A og C dekkes.*

*Når det gjelder dyrefôr ansees det naturlige vitamininnholdet i mais å være uten betydning da all mais som benyttes som fôr vitaminberikes i henhold til Mattilsynets anbefalinger. Tilsvarende angis krav til*

*ernæringsmessig sammensetning av kornbasert barnemat i vedlegg 1 i Forskrift om bearbejdet kornbasert barnemat og annen barnemat til spedbarn og småbarn (FOR 2002-10-18 nr 1185). Faggruppen vurderer derfor at et eventuelt avvikende nivå av vitamin A og C i MON 87460 har liten ernæringsmessig betydning i Norge.*

Med unntak for tørketoleranse viser feltforsøk ingen signifikante forskjeller mellom den transgene maislinjen MON 87460 og kontrollinjer med hensyn på agronomiske og morfologiske karakterer. Det ble ikke observert endringer i andre karakterer knyttet til vegetativ vekst, reproduksjon, fitness og persistens, som kan indikere økt selektiv fordel og økt sannsynlighet for spredning av den tørketolerante maislinjen utenfor dyrking.

### **Toksisitet og allergenitet**

CspB- og NPTII-proteinet, som uttrykkes som følge av genmodifiseringen, har ingen likheter med kjente toksiner og allergener, eller egenskaper som tilsier at det vil virke som et allergen eller toksin. Innholdet av disse proteinene i korn er ca 0,00007 % av totalt protein, og utgjør således en svært liten del av det totale proteininnholdet. Faggruppen finner det lite sannsynlig at eksponering av CspB- og NPTII-proteinet i seg selv og i de mengder som tilføres via genmodifisert mais er helsemessig betenkelig. En akutt føringstudie (oral sondeføring) på mus med bakterieframstilt CspB- og NPTII-protein viser ingen skadelige helseeffekter. Videre konkluderer ernæringsstudier med broilere at maislinjen MON 87460 er ernæringsmessig lik umodifisert mais.

Resultater fra 90-dagers føringforsøk på rotter viser statistisk signifikante forskjeller mellom fôrgruppene med hensyn på enkeltparametre. Søker betrakter de påviste forskjellene som ikke toksikologisk relevant. Dette fordi forskjellene kun ble detektert i enkelte fôrgrupper (forskjellig fôrgruppe for hann- og hunndyr). I tillegg vises det til at de statistisk signifikante forskjellene som ble påvist ligger innenfor WIL Research Laboratories historiske data, som omfatter fra 560 til 685 rotter.

### **Antibiotikaresistens**

Det innsatte *nptII*-genet koder for resistens mot enkelte aminoglykosider som benyttes i norsk landbruk (VKM 2005). De tilgjengelige data viser at forekomsten av *nptII*-genet i patogene bakterier i Norge er lav. Kunnskap om forekomsten av *nptII*-genet i miljøet er imidlertid mangelfull.

*Flertallet i faggruppen konkluderer med at tilstedeværelse av nptII-gener i mat og fôr produsert fra den genmodifiserte maisen MON 87460 ikke er en signifikant kilde til nptII-gener i bakterier som lever i menneskets og dyrs tarmsystem, sammenlignet med de nptII-genene som allerede er tilstede i bakteriepopulasjonen i tarmen.*

*Et mindretall i faggruppen (K. M. Nielsen, A. Myhr, T. Bøhn, O. Stabbetorp) påpeker store forskjeller i geografisk utbredelse av antibiotikaresistens i Europa, og at det mangler publisert dokumentasjon på forekomsten av nptII-genet i Norge. I fravær av vitenskaplig dokumentasjon, antas resistensgenforekomsten å være lav. Det påpekes at neomycin benyttes i norsk landbruk, og at et seleksjonstrykk på eventuelle sjeldne transformanter derfor ikke kan utelukkes. Antibiotikaene som genet gir resistens imot er klassifisert av European Medicines Agency (EMA 2007) og WHO (2005) som "critically important". NptII-genet flankeres av loxP- seter hentet fra bakteriofagen P1. LoxP er et rekombinasjonssete for enzymet Cre. Det kan ikke utelukkes at ulike enterobakterier som er infisert med P1 (og beslektede) bakteriofager vil ha en høyere sannsynlighet for å gjenkjenne disse setene, rekombinere med og derav integrere nptII-genet. P1-bakteriofagen er påvist i en rekke ulike bakteriearter som finnes i mage-tarmkanalen hos mennesker og husdyr. Tidligere risikovurderinger av ARMG utført av EFSA (2009a) og VKM (2005) har ikke vurdert genoverføringspotensiale for transgener som er flankert av bakterielle rekombinasjonsseter. Manglende datagrunnlag for prevalens av nptII- genet i Norge, samt sannsynlig økt rekombinasjon i eksponerte bakterier (P1- infiserte) gjør at mindretallet ikke ønsker å konkludere med hensyn på risiko knyttet til bruk av nptII-genet som antibiotikaresistensmarkør.*

### **Øvrig miljørisiko**

Søknaden gjelder godkjenning av maislinjen MON 87460 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 stedeegne eller introduserte viltvoksende arter som mais kan hybridisere med. Risiko for utkryssing med dyrkede sorter vurderes til å være neglisjerbar.

### **NØKKELOD**

Mais, *Zea mays* (L.), genmodifisert maislinje MON 87460, tørketoleranse, NPTII, CspB, ”cold shock protein B”, antibiotikaresistensmarkørgen, 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.
ARMG	Antibiotikaresistensmarkør
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 <sub>1</sub> , BC <sub>2</sub> 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.
CspB	Cold shock protein B fra bakterien <i>Bacillus subtilis</i>
DN	Direktoratet for naturforvaltning
DNA	Deoxyribonukleinsyre (DNA)
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
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.
GLP	Good Laboratory Practices, retningslinjer for godt laboratoriearbeid.
GMO	Genmodifisert organisme
GMP	Genmodifisert plante
Locus	Spesifikk posisjon på kromosomet der et gen er lokalisert.
MALDITOF	Massespektrometrimetode for å måle molekylvekt til peptider.
MT	Mattilsynet
NDF	Neutral detergent fiber, dvs. fiberfraksjon som inneholder hemicellulose og ADF.
Northern blot	Teknikk for overføring av RNA til en membran for videre studier av overførte RNA-sekvenser.
Nær-isogen linje	Linjer eller sorter som er genetisk identiske, med unntak av ett locus eller kromosomsegment.
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
ORF	Open Reading Frame (åpen leseramme)
OSWP	Overseason whole plant
NPTII	Enzymet neomycin fosfotransferase II gir resistens mot antibiotikaene neomycin og kanamycin.
PCR	Polymerase chain reaction. Polymerase kjedereaksjon. Metode for å syntetisere mange kopier av en DNA-sekvens vha primere.
PV-ZMAP595	Plasmidvektor som er benyttet til å genmodifisere MON 87460
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-plasmid som er i jordbakterien <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Ti-plasmid (Transfer-DNA) overføres fra bakterien, og settes inn i plantecelleens kjernegenom. T-DNAet som overføres avgrenses av V (venstre) og H (høyre) flankesekvenser, og begrenser derfor den delen av Ti-plasmid som overføres og gjør at resten av vektoren ikke blir satt inn i plantekromosomene.
USDA	United States Department of Agriculture
U.S. EPA	United States Environmental Protection Agency, USAs miljøvernmyndigheter
Utviklingsstadier hos mais:	
	<u>Vegetative stadier</u>
	VE: oppspiring
	V1: 1. blad
	V2: 2. blad
	V(n): n'te blad
	VT: synlige hannblomsterstand (tassel)
	<u>Reproduktive stadier</u>
	R1: synlige hunnblomster
	R2: 'blister'
	R3: melkmodning
	R4: deigmodning
	R5: dent
	R6: fysiologisk moden
Western-blot	Metode for overføring av proteiner til en membran som binder protein.
WHO	World Health Organisation. Verdens helseorganisasjon, organ under FN

## INNHOLDSFORTEGNELSE

VURDERT AV .....	2
SAMMENDRAG .....	3
NØKKEWORD .....	5
FORKORTELSER OG ORDFORKLARINGER .....	6
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 .....	12
2.1. Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon .....	12
2.2. Karakterisering av geninnsettingen/genkonstruksjonen .....	12
2.3. Informasjon vedr. uttrykk av introduserte gener og åpne leserammer (ORF) .....	16
2.4. Nedarving og stabilitet av innsatt DNA .....	19
2.5. Delkonklusjon .....	19
3. Komparative analyser .....	20
3.1. Forsøksdesign og valg av komparator .....	20
3.2. Analyser av ernæringsmessige komponenter .....	21
3.3. Agronomiske egenskaper .....	24
3.4. Delkonklusjon .....	25
4. Dokumentasjon av toksisitet og allergenisitet .....	28
4.1. Toksisitet .....	28
4.2. Allergenisitet .....	29
4.3. Delkonklusjon .....	30
5. Miljørisikovurdering .....	31
5.1. Potensiale for utilsiktede effekter på fitness relatert til genmodifiseringen .....	31
5.2. Potensiale for genoverføring .....	31
5.3. Overvåking .....	34
5.4. Delkonklusjon .....	34
6. Vurdering av søkers dokumentasjon .....	36
KONKLUSJON .....	38
REFERANSER .....	40
VEDLEGG 1 .....	44



## BAKGRUNN

Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet er bedt av Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning om å foreta en vurdering av helse- og miljørisiko ved en eventuell godkjenning av den genmodifiserte maislinjen MON 87460 fra Monsanto (EFSA/GMO/NL/2009/70). 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 nederlandske myndigheter i mai 2009. Dokumentasjonen knyttet til søknaden ble lagt ut på EFSA-nett 28. januar 2010, med frist på 90-dager for innspill fra EU- og EØS/EFTA-landene. Norge har ikke tidligere uttalt seg om MON 87460.

Etter det faggruppen kjenner til er MON 87460 foreløpig ikke godkjent for kommersiell dyrking eller omsetning som mat og/eller fôr i noen land (Agbios 2010; EFSA/GMO/NL/2009/70). I henhold til søker er linjen imidlertid søkt godkjent i USA, Canada og Mexico for alle bruksområder, inkludert dyrking. I tillegg foreligger det søknader om markedsføring av maislinjen som mat og fôr i en rekke land. Disse søknadene er i ulike faser av godkjenningsprosessen.

## OPPDRAK FRA DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING OG MATTILSYNET

Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning har i brev datert 12.5.2006 (ref. 2006/17817) og 23.03.2010 (ref. 2008/4367 ART-BI-BRH) gitt Vitenskapskomiteen for mattrygghet løpende oppdrag om å utarbeide vitenskapelige innspill og foreløpige helse- og miljørisikovurderinger av genmodifiserte planter og avledete 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 GMO Extranet.

Søknad EFSA/GMO/NL/2009/70, genmodifisert maislinje MON 87460, ble lagt ut på EFSA-nett 28. januar 2010. 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 i første rekke fokusere på miljørisiko i Norge, og sekundært i EØS-området. For søknader som ikke omfatter dyrking i EØS-området kan VKM omtale risiko knyttet til dyrking av produktet i risikovurderingen. VKM skal imidlertid kun konkludere på miljørisikoen produktet medfører i EØS-området for de omsøkte bruksområdene.

### *Produktet som ønskes vurdert*

Genmodifisert mais, EFSA/GMO/NL/2009/70 (MON 87460).

Unik kode: MON-87460-4

Status i EU: Søknad under forordning 1829/2003/EF. Frist for innspill til EFSA GMO Extranet: 28.04.10.

Ønsket svarfrist til Mattilsynet/DN: 23.04.10.

# RISIKOVURDERING

## 1. Innledning

Helse- og miljøvurderingen av den genmodifiserte mais MON 87460 er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSA's nettside EFSA GMO Extranet. I tillegg er det benyttet uavhengige vitenskapelige publikasjoner med referee i vurderingen. Vurderingen er gjort i henhold til tiltenkt bruk og i overensstemmelse med miljø- og helsekravene i genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven. Videre er kravene i EUs forordning 1829/2003/EF og utsetningsdirektiv 2001/18/EF med annekser lagt til grunn for vurderingen.

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

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

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

### 1.1. Beskrivelse av egenskaper og virkningsmekanismer

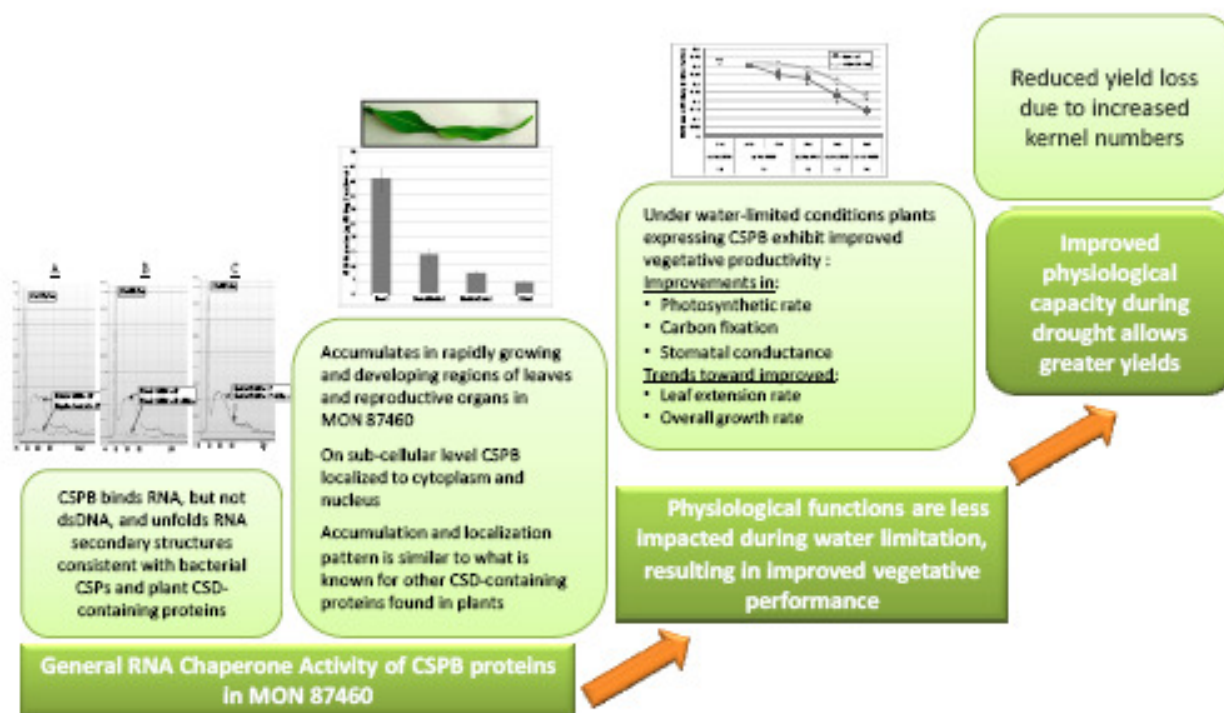
Maislinjen MON 87460 er fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformasjon av embryogent vev fra den konvensjonelle maislinjen LH59. Den innsatte genkonstruksjonen inneholder et modifisert *cpsB*-gen fra jordbakterien *Bacillus subtilis*, som koder for "Cold shock protein B" (CspB). Uttrykket av *cspB*-genet er under kontroll av en konstitutiv promotor fra ris aktin-genet.

CspB-proteinet hører til proteinfamilien CSP, en gruppe av små proteiner som inneholder en høyt konservert RNA-bindende sekvens identifisert som "cold shock"-domene (CDS). CDS antas å fungere som en såkalt "RNA-chaperone" (Graumann *et al.* 1997), og er kjent å øke adaptasjonen til abiotisk stress både hos bakterier (e.g. *B. subtilis*, *E. coli*) og planter (e.g. *Arabidopsis*, hvete, ris) (ref. Castiglioni *et al.* 2008). CSP gjenkjenner enkelttrådede polynukleotider uten tydelig sekvensspesifisitet, og fremmer initiering av translasjon ved å destabilisere sekundære strukturer i mRNA under ulike stressbetingelser (lav/høy temperatur, salt, vannmangel etc.) (Graumann *et al.* 1997 Castiglioni *et al.* 2008). CDS-proteiner akkumulerer i plantevev som er i aktiv vekst. I henhold til søker vil CspB-proteinet bidra til normal cellefunksjon i raskt voksende vev og reproduktive organer under moderat tørkestress, og minimere effekter av vannmangel på fotosyntese, stomatakonduktanse og karbonfikseringsrate (figur 1).

Mais er spesielt utsatt for tørkestress under blomstring og i forbindelse med mating av kornet. I henhold til Castiglioni *et al.* (2008) vil redusert vanntilgang rett før blomsterinitiering eller rett etter pollinering ha spesielt stor effekt på den totale frøavlingen hos mais. Tørkestress under den vegetative vekstfasen medfører ofte redusert produktivitet og en reduksjon i antall maiskorn per kolbe. Avhengig av graden av tørkestress vil redusert vanntilgang på seinere utviklingsstadier, eksempelvis R2-R3, medføre avlingstap ved at frøstørrelsen blir redusert, eller at det ikke utvikles frø.

Den introduserte egenskapen vil i henhold til søker bidra til økt avlingspotensiale, primært gjennom en økning i antall maiskorn per kolbe. Ved omfattende og langvarig tørke vil imidlertid også avlingene av MON 87460 bli kraftig redusert på linje med konvensjonelle maissorter. I henhold til Gastiglioni *et al.* (2008) er det ikke observert pleiotrofe effekter knyttet til Csp-proteiner i mais, noe som indikerer at stresstoleransen ikke medfører effekter på produktiviteten under tilstrekkelig vanntilgang.

Maislinjen MON 87460 har også fått satt inn antibiotikaresistensmarkørgenet *nptII* fra *E. coli*. *NptII* koder for enzymet neomycin fosfotransferase II, som gir resistens mot aminoglykosidantibiotika som kanamycin og neomycin. Genet er introdusert som seleksjonsmarkør for identifikasjon av transformanter under regenerasjonen.



**Figur 1.** Beskrivelse av virkningsmekanisme og funksjon til CSPB-proteinet (Kilde: EFSA/GMO/NL/2009/70).

## 2. Molekylær karakterisering

### 2.1. Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

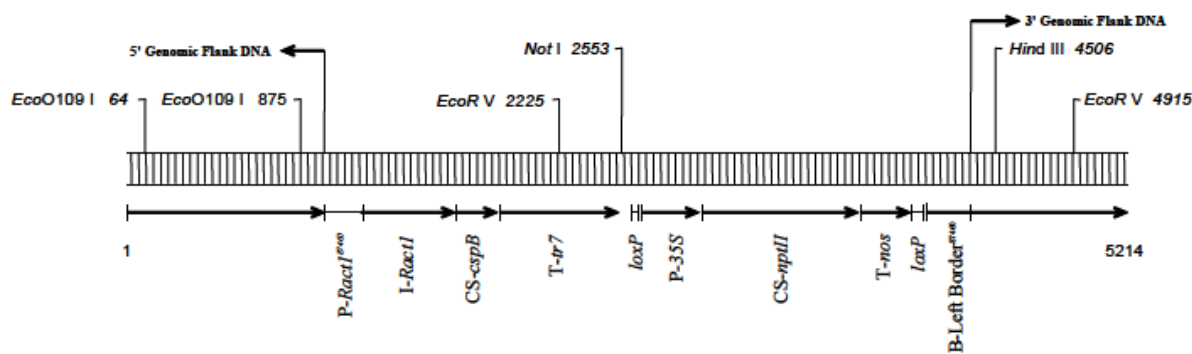
I henhold til søkers dokumentasjon er det benyttet *Agrobacterium*-mediert transformering til produksjon av den transgene maislinjen MON 87460. Plasmidet PV-ZMAP595, som inneholder et rekombinant DNA-fragment, ble benyttet til transformasjon av embryogent vev fra den konvensjonelle maislinjen LH59. Det rekombinante DNA-fragmentet som ble satt inn i maisgenomet inneholder en *cspB*- og en *nptII*-ekspressjonskasset. Transformanter ble selektert ved at de overlevde og vokste i nærvær av paromomycin.

### 2.2. Karakterisering av geninnsettingen/genkonstruksjonen

Ekspressjonskassetten, som koder for CspB-protein, består av promoteren *P-Ract1* og ledersekvensen (intron) *I-Ract1* fra risactingenet *act1*. Videre inneholder ekspressjonskassetten et *cspB*-gen fra *Bacillus subtilis* og en 3' ikke-translatert sekvens *T-tr7* fra *transcript 7*-genet til *Agrobacterium* som avslutter transkripsjonen. (tabell 1). Det rekombinante fragmentet inkluderer i tillegg et *loxP-1/loxP-2* rekombinasjonssete for enzymet Cre-rekombinase. *Cre/lox*-rekombinasjonssystemet er nærmere beskrevet i vedlegg 1.

Mellom *loxP-1/loxP-2*-rekombinasjonssetet sitter *nptII*-ekspressjonskassetten. *NptII*-ekspressjonskassetten består av en *35S* promoter fra brunrotmosaikkvirus (*P-FMV*), *neomycin-fosfotransferase type II*-gen fra transposon Tn5 (fra *E. coli*), samt sekvensen *T-nos* fra nopalinsyntasegenet (*nos*). *Nos*-genet stammer fra bakterien *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA. *T-nos* avslutter (terminerer) transkripsjonen, men uttrykkes ikke i planten (tabell 1, 2 og 3).

Southern blot og sekvensering er benyttet for å karakterisere det rekombinante DNA-fragmentet i planten. Molekylærbiologisk karakterisering viser at det er satt inn bare en kopi av DNA-fragmentet i maisens genom. Innhold av gener og regulatoriske elementer i DNA-fragmentet er beskrevet i figur 2 og tabell 1 og 2).



**Figur 2.** Rekombinant T-DNA fragment i maisens genom.

**Tabell 1.** Beskrivelse av de innsatte genene.

---

<u><i>CspB</i> genkassett</u>	
a) <i>P-Ract1</i>	Ris aktingenets promoter (191 bp)
b) <i>I-Ract1</i>	Ris aktingenets intron (477 bp)
c) <i>CspB</i>	<i>CspB</i> -gensekvensen (cold shock protein B) (204 bp) fra <i>Bacillus subtilis</i>
d) <i>T-tr7</i>	Transkripsjonstermineringssekvens fra <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (508 bp)
<u><i>NptII</i>-genkassett</u>	
a) <i>loxP</i>	Sekvens (34 bp) fra <i>Bacteriophage P1</i> , rekombineringssete for Cre rekombinase (34 bp)
b) P-35S	Blomkålmosaikkvirus (CaMV) promoter (293 bp)
c) <i>nptII</i>	<i>neomycin-fosfotransferase type II</i> gen (794 bp) fra transposon Tn5, stammer fra bakterien <i>E. coli</i>
d) T-Nos	3' Transkripsjonstermineringssekvens (253 bp) fra <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , avslutter transkripsjonen
e) <i>loxP</i>	Sekvens (34 bp) fra <i>Bacteriophage P1</i> , rekombineringssete for Cre rekombinase

---

**Tabell 2.** Sammendrag av genelementer mellom T-DNA-grensene i plasmid PV-ZMAP595.

Genetic element	Position in plasmid	Function and/or reference
T-DNA		
<b>B-Right Border region</b>	2816-3172	DNA from <i>Agrobacterium tumefaciens</i> containing the right border sequence used for transfer of the T-DNA (Depicker <i>et al.</i> 1982). The position of the actual border repeats in the B-Right Border region is from base pair 3107 to 3131.
Intervening Sequence	3173-3204	Sequence used in the DNA cloning
<b>P-Ract1</b>	3205-4128	Promoter and leader from the rice actin gene, <i>act1</i> , of <i>Oryza sativa</i> (McElroy <i>et al.</i> 1990)
<b>I-Ract1</b>	4129-4605	Intron from the rice actin gene, <i>act1</i> , of <i>Oryza sativa</i> (McElroy <i>et al.</i> 1990)
Intervening Sequence	4606-4607	Sequence used in the DNA cloning
<b>CS-cpsB</b>	4608-4811	Codon modified coding sequence of the <i>cspB</i> gene from <i>Bacillus subtilis</i> encoding CspB (Willimsky <i>et al.</i> 1992).
Intervening Sequence	4812-4841	Sequence used in the DNA cloning
<b>T-tr7</b>	4842-5349	3' non-translated sequence of transcript 7 gene from <i>Agrobacterium tumefaciens</i> that directs polyadenylation (Dhaese <i>et al.</i> 1983)
Intervening Sequence	5350-5423	Sequence used in the DNA cloning
<b>loxP</b>	5424-5457	Sequence from <i>Bacteriophage P1</i> for the recombination site recognized by Cre recombinase (Russel <i>et al.</i> 1992)
Intervening Sequence	5458-5483	Sequence used in the DNA cloning
<b>P-35S</b>	5484-5776	Promotor for the 35S RNA of the Cauliflower Mosaic Virus (Odell <i>et al.</i> 1985)
Intervening Sequence	5777-5840	Sequence used in the DNA cloning
<b>CS-nptII</b>	5841-6635	Coding sequence from Tn5 (Beck <i>et al.</i> 1982) in <i>E. coli</i> encoding neomycin and kanamycin resistance (Fraley <i>et al.</i> 1983)
Intervening Sequence	6636-6666	Sequence used in the DNA cloning
<b>T-nos</b>	6667-6919	3' non-translated sequence of the nopaline synthase ( <i>nos</i> ) gene from <i>Agrobacterium tumefaciens</i> which terminates and directs polyadenylation (Bevan <i>et al.</i> 1983)
Intervening Sequence	6920-6944	Sequence used in the DNA cloning
<b>loxP</b>	6945-6978	Sequence from <i>Bacteriophage P1</i> for the recombination site recognized by Cre recombinase (Russel <i>et al.</i> 1992)
Intervening Sequence	6979-6998	Sequence used in the DNA cloning
<b>B-Left Border region</b>	6999-7440	DNA from <i>Agrobacterium tumefaciens</i> containing the left border sequence used for transfer of the T-DNA (Barker <i>et al.</i> 1983). The position of the actual border repeats in the B-Left Border Region is from base pair 7261-7284.

**Tabell 3.** Størrelsesfordeling av gener og regulatoriske elementer i MON 87460.

Genetic element	Location in sequence	Function and/or reference
<b>Sequences flanking 5' end of the insert P-<i>RactI</i><sup>87460</sup></b>	1-1121	Maize genomic DNA
<b>I-<i>RactI</i></b>	1313-1798	Truncated promoter and leader from rice actin gene, <i>act1</i> , of <i>Oryza sativa</i> (McElroy <i>et al.</i> 1990)
Intervening Sequence <b>CS-<i>cpsB</i></b>	1790-1791 1792-1995	Intron from the rice actin gene, <i>act1</i> , of <i>Oryza sativa</i> (McElroy <i>et al.</i> 1990) Sequence used in DNA cloning Codon optimized codon sequence of the <i>cspB</i> gene from <i>Bacillus subtilis</i> encoding CspB (Willimsky <i>et al.</i> 1992)
Intervening Sequence <b>T-<i>tr7</i></b>	1996-2025 2026-2583	Sequence used in DNA cloning 3' non-translated sequence of transcript 7 gene from <i>Agrobacterium tumefaciens</i> that directs polyadenylation (Dhaese <i>et al.</i> 1983).
Intervening Sequence <b>loxP</b>	2534-2607 2608-2641	Sequence used in DNA cloning Sequence from <i>Bacteriophage P1</i> for the recombination site recognized by Cre recombinase (Russel <i>et al.</i> 1992).
Intervening Sequence <b>P-35S</b>	2642-2667 2668-2960	Sequence used in DNA cloning Promotor for the 35S RNA of the Cauliflower Mosaic Virus (Odell <i>et al.</i> 1985).
Intervening Sequence <b>CS-<i>nptII</i></b>	2961-3024 3025-3819	Sequence used in DNA cloning Coding sequence from Tn5 (Beck <i>et al.</i> 1982) in <i>E. coli</i> encoding neomycin and kanamycin resistance (Fralely <i>et al.</i> 1983)
Intervening Sequence <b>T-<i>nos</i></b>	3820-3850 3851-4103	Sequence used in DNA cloning 3' non-translated sequence of the nopaline synthase ( <i>nos</i> ) gene from <i>Agrobacterium tumefaciens</i> which terminates and directs polyadenylation (Bevan <i>et al.</i> 1983)
Intervening Sequence <b>loxP</b>	4104-4128 4129-4162	Sequence used in DNA cloning Sequence from <i>Bacteriophage P1</i> for the recombination site recognized by Cre recombinase (Russel <i>et al.</i> 1992)
Intervening Sequence <b>B-Left Border</b> <sup>87460</sup>	4163-4182 4183-4430	Sequence used in DNA cloning Truncated DNA region from <i>Agrobacterium tumefaciens</i> containing the left border sequence used for transfer of the T-DNA (Barker <i>et al.</i> 1983)
<b>Sequence flanking 3' end of the insert</b>	4431-5214	Maize genomic DNA

Molekylærbiologiske analyser viser at det rekombinante fragmentet i planten inneholder de samme gener og genelementer som er på det tilsvarende T-DNA I-fragmentet i plasmidet PV-ZMAP595.

CspB-proteinet som uttrykkes i maisplanten er undersøkt med Edman-degraderingmetode for trinnvis fjerning av 15 N-terminal aminosyrer, Western-blot analyse og densitometri, SDS-PAGE og densitometri, trypsinbehandling av proteinet og peptidkartlegging med MALDITOF massespektrometri, Southern blot-analyse med probe mot *cspB*-genet, undersøkelse med "Dual Labeled Probe (DLP)" for å se på funksjonell aktivitet til CspB-proteinet samt glykosyleringsanalyse. DLP-undersøkelsen viser at rensset planteprodusert CspB og *E. coli*-produisert CspB-protein har samme destabiliseringsaktivitet overfor et 35 basepar (bp) oligonukleotid med en 23 bp "Hair-pin" struktur som har 6 bp dobbeltråd.

NPTII-proteinet som uttrykkes i maisplanten er undersøkt ved hjelp av Western-blot analyse og densitometri, SDS-PAGE og densitometri, samt Southern blot analyse med probe mot *nptII*-genet. Det er ikke utført andre analyser av NPTII-proteinet, men søker henviser til studier utført av Fuchs *et al.* (1993) og vurderinger fra U.S. FDA (1994).

PCR-analyser av det rekombinante DNA-fragmentet i MON 87460 viser at fragmentet er på 3309 bp. Ved innsetningen av DNA-fragmentet ble 733 bp fjernet (dvs. fra bp 3205 til bp 3937) fra *P-RactI*-promoterelement (tabell 2). Base 3938, som er lokalisert i plasmidet PV-ZMAP595 *P-RactI*-promoterelementet, er startpunkt i 5'-enden til det rekombinante DNA-fragmentet i MON 87460. Base 7246 som er lokalisert i venstre grenseregionen i PV-ZMAP595 er DNA-fragmentets slutt punkt i 3'-enden til det rekombinante DNA-fragmentet i MON 87460. Størrelsen på *P-RactI*-promoterelement i MON 87460 er altså på 191 bp (tabell 3).

PCR-analyser av flankesekvensene til det rekombinante DNA-fragmentet i MON 87460 viser at flankesekvensene er genomisk DNA fra mais. Flankerende sekvenser til det rekombinante DNA-fragmentet er sekvensert, 1121 bp oppstrøms (5'-enden til genet) og 784 bp nedstrøms (3'-enden til genet). For å bestemme DNA-sekvensen på pre-integrasjonssetet ble det utført PCR-analyse på DNA fra den umodifiserte foreldrelinjen LH59. Lokaliseringen av primerne i LH59-genomet er i tilsvarende sekvenser som 5'- og 3'-enden til det rekombinante fragmentet i MON 87460. Den teoretiske størrelsen til PCR-produktet skal være ca. 600 bp, forutsatt at det ikke har skjedd delelsjoner eller addisjoner av DNA-sekvenser i integrasjonssetet. Sekvensering av PCR-produktet viser at i integrasjonssetet er det en delelsjon på 22 bp i MON 87460 i forhold til sekvensene i LH59.

PCR-analyser og sekvensering av insertet i MON 87460 viser at DNA-sekvensene hos både *cspB* og *nptII* er identiske til de korresponderende sekvensene på plasmidet PV-ZMAP595. Plasmidelementer utenfor T-DNA grenseområdene, som *aadA*-genet og unike plasmidsekvenser som *ori.pBR322*, ble ikke påvist i MON 87460 ved bruk av Southern-blot metode.

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

I dokumentasjonen fra søker presenteres resultater fra to proteinekspressjonsstudier med maislinjen MON 87460. Feltforsøkene, som ligger til grunn for studiene, ble gjennomført på henholdsvis seks lokaliteter i representative områder for maisdyrking USA vekstsesongen 2006, og fire lokaliteter i Chile i 2006/2007. Forsøkene i USA ble gjennomført under ordinære dyrkingsbetingelser, og ble etablert som fullstendig randomiserte blokkdesign med 3 gjentak. Forsøkene inkluderte foruten testlinjen MON 87460, en umodifisert maislinje (LH59) med tilsvarende genetisk bakgrunn som testlinjen (negativ kontroll).

I de chilenske feltforsøkene ble det benyttet et strip-plot forsøksdesign med tre gjentak pr lokalitet, med vanningsregime som hoved-plot og maislinje (test/kontroll) som sub-plot. Hoved-plotene var arrangerte som randomiserte blokkdesign, med sub-plotene tilfeldig fordelt innen hvert gjentak, men konsistent over hvert hoved-plot. Vanningen ble foretatt slik at halvparten av hoved-plotene fikk tilstrekkelig vann til at plantene ga optimal frøavling. På de øvrige hoved-plotene ble maisplantene utsatte for tørkestress under siste del av den vegetative og begynnelsen av den reproduktive vekstfasen (ca V10 – R2).



Ekspressjonen av CspB- og NPTII-proteinene ble målt ved hjelp av enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) i ulike plantevev og på forskjellige vekststadier. Det ble tatt prøver av blad, rot, hel plante på fire ulike stadier under den vegetative vekstfasen. I tillegg ble det tatt prøver av fôrfraksjon i fase R2 (dent), pollen og hunnblomster (arr) under pollineringen, frø ved fysiologisk modning (R6) og stilk/blad (restfraksjon) rett etter høsting.

Analyse av samtlige forsøk viste at nivåene av CspB generelt ble redusert utover i vekstsesongen (tabell 4). Konsentrasjonen av proteinet varierte mellom 0,086-5,1 µg/g tørrvekt (t.v.) i blad, 0,77-1,6 µg/g t.v. i rot, 0,11-5,2 µg/g t.v. i hel plante, 8,9-48 µg/g t.v. i pollen, 0,024-0,1 µg/g t.v. i frø og 0,31-1,8 µg/g t.v. i hunnblomster.

Resultatene fra feltforsøkene i USA viste gjennomsnittlige konsentrasjoner av CspB på henholdsvis 0,072 µg/g t.v. i frø, 0,47 til 3,1 µg/g t.v. i blad, 0,1 µg/g t.v. i fôr, 13 µg/g t.v. i pollen, 0,24-1,4 µg/g t.v. i røtter, 0,67-2,8 µg/g t.v. i hel plante, 1,2 µg/g t.v. i hunnblomster og 0,042 µg/g t.v. i restfraksjon etter høsting (tabell 4).

Tilsvarende viste de chilenske forsøkene gjennomsnittlige nivåer av CspB-protein på 0,048 µg/g t.v. i frø ved rikelig vanntilgang og 0,038 µg/g t.v. ved tørkestress (tabell 4). I blad varierte konsentrasjonen av proteinet mellom 0,39 til 2,8 g/g t.v. ved rikelig vanntilgang, og 0,44 til 2,8 µg/g t.v. ved tørkestress. Tilsvarende tall for hel plante var henholdsvis 0,67-3,2 µg/g t.v. og 0,70 – 2,9 µg/g t.v. I fôrfraksjonen ble det målt gjennomsnittlige konsentrasjoner av CspB-protein på 0,11 µg/g t.v. ved tilstrekkelig vanning og 0,15 µg/g t.v. ved tørkestress, mens det i pollen ble målt gjennomsnittlige konsentrasjoner på henholdsvis 25 og 27 µg/g t.v.

Analyse av samtlige forsøk i USA og Chile viste at konsentrasjonen av NPTII-protein var høyest i unge blad (2,4-2,8 µg/g t.v.) og lavest i frø (dvs. under kvantifiseringsgrensen på 0,0047 µg/g råvekt).

Teoretiske analyser av mulige polypeptider fra hver leseramme v.h.a. FASTA algoritmer og sammenligning med proteinsekvenser i databasene allergen (AD\_2009)-, toksin (TOX\_2009)- og protein (PRT\_2009)-databaser viser ingen strukturelle likheter til allergener, toksiner og farmakologiske aktive proteiner. Det er imidlertid funnet 4738 peptidsekvenser med E-score mindre eller lik  $10^{-5}$  for aminosyresekvensene i CspB-protein. De teoretiske analysene viser at størsteparten av de påviste aminosyresekvensene er homologe til peptidsekvenser i forskjellige naturlig eller teoretisk laget proteiner beskrevet som cold shock proteiner. Det ble påvist 100 % aminosyrehomologi til et patentert, ikke navngitt protein (patentnr. GI-63092813). Proteinene gir stresstoleranse for en transgen plante. Nest og tredje beste homologitreff ga også 100 % identitet. Ett av proteinene ble identifisert som CspB-protein, det andre er et navngitt protein med patentnummer GI-63092738. 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 eller allergene konsekvenser.

**Tabell 4.** Gjennomsnittlige konsentrasjoner av CspB-protein ( $\mu\text{g/g t.v.}$ ) målt i ulike plantevev av MON 87460. Fra feltforsøk i USA vekstsesongen 2006 og fra 3 av 4 forsøkssteder i Chile vekstsesongen 2006/2007. I de chilenske forsøkene ble det tatt prøver av både planter dyrket med tilstrekkelig vanntilgang og planter som var utsatte for tørkestress.

		Feltforsøk i USA 2006	Feltforsøk i Chile 2006/2007	
		Gj. konsentrasjon (Variasjonsområde) ( $\mu\text{g/g t.v.}$ )	Tilstrekkelig vanntilgang	Tørkestress
Vevstype	Utviklings- trinn <sup>1</sup>		Gj. konsentrasjon (Variasjonsområde) ( $\mu\text{g/g t.v.}$ )	Gj. konsentrasjon (Variasjonsområde) ( $\mu\text{g/g t.v.}$ )
<b>Blad</b>	V2-V4	3,1 (2,0-5,1)	2,8 (1,7-4,5)	2,8 (1,7-4,2)
	V6-V8	2,2 (1,0-4,4)	2,6 (0,96-3,8)	2,6 (1,1-3,6)
	V10-V12	1,0 (0,54-1,5)	0,56 (0,10-1,5)	0,45 (0,086-1,1)
	~ VT	0,47 (0,16-0,96)	0,39 (0,18-0,58)	0,44 (0,22-0,69)
<b>Røtter</b>	V2-V4	1,4 (0,55-2,4)	1,3 (0,79-1,8)	1,5 (0,95-2,2)
	V6-V8	1,0 (0,25-1,6)	0,86 (0,70-1,4)	0,82 (0,74-0,95)
	V10-V12	0,43 (0,077-0,84)	0,49 (0,27-0,62)	0,41 (0,24-0,63)
	~ VT	0,24 (0,098-0,42)	0,31 (0,22-0,45)	0,40 (0,28-0,52)
<b>Hel plante</b>	V2-V4	2,8 (1,1-5,2)	3,2 (1,8-4,8)	2,9 (1,8-3,8)
	V6-V8	1,9 (0,86-3,4)	2,3 (1,4-3,0)	2,2 (1,4-3,1)
	V10-V12	0,88 (0,45-1,4)	0,89 (0,59-1,4)	0,71 (0,44-1,1)
	~ VT	0,67 (0,11-1,3)	0,67 (0,48-0,98)	0,70 (0,55-1,0)
<b>Rot etter høsting</b>		0,041 (0,014-0,36)	0,031 (0,020-0,061)	0,052 (0,019-0,14)
<b>Fôr</b>	R2	0,10 (0,041-0,17)	0,11 (0,077-0,14)	0,15 (0,087-0,22)
<b>Restfraksjon etter høsting</b>		0,042 (0,013-0,090)	0,033 (0,018-0,040)	0,072 (0,035-0,12)
<b>Hunnblomster</b>	R1	1,2 (0,31-1,8)	0,82 (0,50-1,5)	1,1 (0,49-1,8)
<b>Pollen</b>	R1	13 (10-17)	25 (8,9-33)	27 (18-48)
<b>Frø/korn</b>	R6	0,072 (0,045-0,10)	0,048 (0,033-0,075)	0,038 (0,024-0,053)

<sup>1</sup>Utviklingsstrinnene er beskrevet i oversikten over ordforklaringer/forkortelser

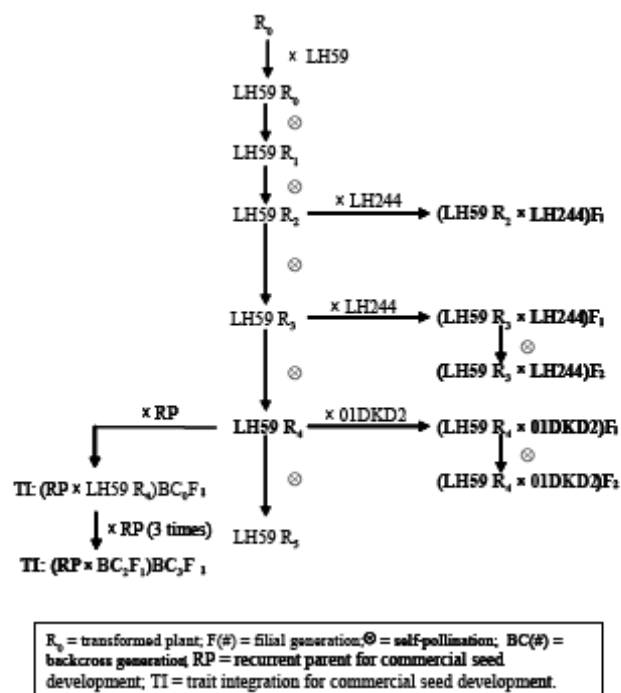
## 2.4. Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

I henhold til søkers dokumentasjon er genetisk stabilitet undersøkt ved analyse av genomisk DNA fra 7 ulike generasjoner med konvensjonelle kryssinger (se figur 3). Resultatene av Southern blot-analysene viser at det rekombinante DNA-innskuddet er stabilt integrert i genomet og nedarves stabilt over generasjoner.

Fenotypisk stabilitet er vist ved undersøkelse av nedarvingsmønsteret av *cspB*-genet mellom 7 ulike generasjoner av MON 87460 (to generasjoner etter selvbestøvning ( $R_1$  og  $R_2$ ), og fem tilbakekryssingsgenerasjoner) (tabell 5). Segregasjonsanalysene (chi-kvadrat-test) viser forventet spaltningstall for tørketoleranse, og det konkluderes med at det rekombinante DNA-fragmentet følger mønsteret for mendelsk nedarving av et enkelt, dominant lokus.

## 2.5. Delkonklusjon

Faggruppen har vurdert de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av proteinene og funnet at informasjonen er tilstrekkelig. Faggruppen konkluderer med at karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i MON 87460 er tilfredsstillende.



**Figur 3.** Kryssingsskjema som viser produksjon av testlinjen MON 87460.

$F_1$ -generasjonen ( $LH59 R_3 \times LH244$ ) ble benyttet til molekylær karakterisering av MON 87460.  $F_1$ -generasjonen ( $LH59 R_2 \times LH244$ ), ( $LH59 R_3 \times LH244$ ) $F_1$ , ( $LH59 R_3 \times LH244$ ) $F_2$ ,  $LH59 R_4$ , ( $LH59 R_4 \times 01DKD2$ ) $F_1$ , ( $LH59 R_4 \times 01DKD2$ ) $F_2$ , og ( $RP \times BC_3F_1$ )  $BC_3F_1$  ble benyttet for undersøkelser av stabilitet. Generasjonene ( $LH59 R_3 \times LH244$ ) $F_2$  og ( $LH59 R_4 \times 01DKD2$ ) $F_2$  ble benyttet i studier av proteinkonpresjon og komparative analyser. ( $LH59 R_3 \times LH244$ ) $F_1$ , ( $LH59 R_4 \times 01DKD2$ ) $F_1$  og ( $LH59 R_4 \times 01DKD2$ ) $F_1$  ble benyttet i feltforsøk for evaluering av agronomiske karakterer og økologiske interaksjoner i USA i 2006 og 2007, samt i Chile 2006/2007. H1548126 og DM1718 ble benyttet som konvensjonelle kontroller. H1548126 er resultat av kryssinger mellom LH244 og LH59, mens DM1718 er avledet av en kryssing mellom 01DKD2 og LH59.

**Tabell 5.** Nedarvingsmønster for *cspB*- genet mellom ulike generasjoner av MON 87460.

Generasjon	Antall planter	Observert		Forventet		Chi-kvadrat	Sannsynlighet ( $\alpha = 0,05$ )
		Positiv	Negativ	Positiv	Negativ		
<b>R<sub>1</sub></b>	36	26	10	27	9	0,148	Ns
<b>R<sub>2</sub></b>	89	89	0	89	0	Fiksert	-
<b>BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub></b>	178	84	94	89	89	0,562	Ns
<b>BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub></b>	154	124	30	115,5	38,5	2,502	Ns
<b>BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub></b>	474	474	0	474	0	Fiksert	-
<b>BC<sub>4</sub>F<sub>1</sub></b>	80	44	36	40	40	0,800	Ns
<b>BC<sub>5</sub>F<sub>1</sub></b>	82	44	38	41	41	0,439	Ns

\* Kritisk Chi-kvadrat-verdi ved  $\alpha=0,05$ ,  $df=1$  er 3,841,

Ns – ikke signifikant

### 3. Komparative analyser

#### 3.1. Forsøksdesign og valg av komparator

I følge dokumentasjonen fra Monsanto er den transgene maislinjen MON 87460 testet i en serie feltforsøk over en vekstsesong i USA og i Chile for evaluering av ernæringsmessige komponenter.

De nordamerikanske forsøkene var lokalisert på seks ulike steder i sentrale dyrkingsområder for mais i USA (Iowa, Illinois, Indiana, Kansas og Nebraska) vekstsesongen 2006. Den umodifiserte maislinjen H1548126 ble benyttet som kontroll i forsøkene. I henhold til søker er H1548126 avledet av en krysning mellom LH244 og LH59, og har tilnærmet samme genetiske bakgrunn som den transgene linjen (se figur 3), men inneholder ikke de rekombinante DNA-fragmentene og uttrykker ikke CspB- og NPTII-proteiner.

I tillegg til testlinje og kontroll, inkluderte forsøkene 18 kommersielle referansesorter (3 sorter pr forsøkssted), tilpasset dyrkingsforholdene på de ulike testlokalitetene. Forsøksfeltene ble lagt ut som fullstendig randomiserte blokkdesign med 3 gjentak. På to av forsøksfeltene ble det supplert med kunstig vanning.

Forsøkene i Chile var lokalisert på fire steder i sentrale dyrkingsområder for mais (Calera de Tango, Colina, Lumbreras og Quillota) i 2006/2007. Resultatene fra feltforsøket på lokaliteten Quillota ble analysert separat. Dette fordi de fire kommersielle, umodifiserte referansesortene ikke utviste samme fenotypisk respons som på de tre andre lokalitetene. Den umodifiserte maislinjen DM1718 ble benyttet som kontroll i forsøkene. I henhold til søker er DM1718 en krysning mellom 01DKD2 og LH59, og har tilnærmet samme genetiske bakgrunn som den transgene linjen (figur 3), men inneholder ikke de rekombinante DNA-fragmentene og uttrykker ikke CspB- og NPTII-proteiner. I tillegg inkluderte forsøkene fire kommersielle, umodifiserte referansesorter pr testlokalitet, til sammen 16 sorter.

For å kunne sammenligne test- og kontrollinjer under to ulike vanningsregimer, ble feltforsøkene lagt ut som split-plot design med tre gjentak pr lokalitet, med vanningsregime som hoved-plot og maislinje (test/kontroll/referansesort) som sub-plot. Hoved-plotene var arrangerte som randomiserte blokkdesign, med sub-plotene tilfeldig fordelt innen hvert gjentak, men konsistent over hvert hoved-plot. Vanningen ble foretatt ved at halvparten av hoved-plotene fikk tilstrekkelig vann til at plantene ga optimal frøavling. På de øvrige hoved-plotene ble maisplantene utsatte for tørkestress under siste del av den vegetative og begynnelsen av den reproduktive vekstfasen (ca V10 – R2). Dette er de vekstfasene som maisplantene er mest utsatte for tørkestress, og som har størst innvirkning på avlingspotensialet.

### *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 både fôr og maiskorn/frø.

Fôrfraksjonen er analysert for innhold av aske, vann, fett, protein, ADF (acid detergent fiber), NDF (neutral detergent fiber), karbohydrater, kalsium og fosfor, mens følgende parametere er undersøkt i frø: protein, fett, aske, vann, karbohydrater, ADF, NDF, total fiber, aminosyrer, fettsyrer (C8-C24), fosfor, jern, kalium, kalsium, kobber, magnesium, mangan, natrium, sink, vitaminene A, B1 (tiamin), B2 (riboflavin), B3 (niacin), B6 (pyridoksin), totalmengde vitamin E og folinsyre (vitamin B9), antinæringsstoffene raffinose og fytinsyre, samt de sekundære metabolittene furfural, cumarsyre og ferulsyre. Totalt ble det analysert for 77 komponenter. Analysene ble utførte under god laboratoriepraksis (GLP) (US EPA 40 CFR PART 160).

Analyser av prøver fra feltforsøkene i USA og Chile viste at innholdet av henholdsvis 15 og 16 av komponentene var lavere enn påvisningsgrenene. Dette medførte at følgende komponenter ble ekskludert fra de statistiske analysene: kaprylsyre (8:0), kaprinsyre (10:0), laurinsyre (12:0), myristinsyre (14:0), myristoleinsyre (14:1), pentadekansyre (15:0), pentadekensyre (15:1), heptadekansyre (17:0), heptadekensyre (17:1), gamma linolensyre (18:3), eikosadiensyre (20:2), ekosatriensyre (20:3), arakidonsyre (20:4), furfural og natrium. I tillegg ble palmitolsyre (16:1) eliminert fra de chilenske feltforsøkene. Generelt er det lavt innhold av disse komponentene i mais (OECD 2002). Totalt ble det gjennomført statistiske analyser av totalt 62 komponenter i prøver fra feltforsøk i USA (9 i fôrprøver og 53 i maiskorn), og 61 fra forsøk i Chile (9 i fôr og 52 i maiskorn).

### *Fôrfraksjon*

Fôrfraksjonen ble analysert for innhold av følgende komponenter: aske, vann, fett, protein, total fiber, ADF (acid detergent fibre), NDF (neutral detergent fibre) kalsium, fosfor og karbohydrater. I henhold til søker viste de kombinerte analysene over tre lokaliteter i Chile, med unntak for variabelen totalt fett ( $p < 0,05$ ), ingen signifikante forskjeller mellom den transgene linjen og kontroll. Analyser av data fra lokaliteten Quillota viste imidlertid signifikante forskjeller for parameterne vann, protein og totalt fett ( $p < 0,05$ ) hos planter som ble utsatt for tørkestress. For samtlige analyserte komponenter ligger verdiene innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen, og toleranseintervallene for Monsanto referansesorter som inngikk i studien.

### *Hovedkomponenter i maiskorn*

Innhold av hovedkomponenter er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002). Følgende komponenter ble analysert: aske, fett, protein, vann, karbohydrater, total fiber, ADF og NDF. Kombinerte analyser over lokaliteter viser ingen signifikante forskjeller for majoriteten av de analyserte komponentene. I de nordamerikanske forsøkene ble det imidlertid funnet signifikante forskjeller mellom testlinjen og kontroll for parameteren aske ( $p < 0,05$ ). Resultater fra tre av forsøksstedene i Chile viste signifikante forskjeller for innhold av totalt fett ( $p < 0,05$ ). På lokaliteten Quillota (analysert separat), ble det påvist signifikante forskjeller mellom MON 87460 og umodifisert kontroll for vanninnhold og protein ved tilstrekkelig vanntilgang, og innhold av karbohydrater og NDF ( $p < 0,05$ ) i prøver fra planter som var utsatte for tørkestress. Verdiene for disse komponentene ligger

innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen, og toleranseintervallene for referansesortene som inngikk i studien

#### *Mineraler*

Mineraler er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Dokumentasjonen fra søker inneholder analyser av mineralene fosfor, jern, kalium, kalsium, kobber, magnesium, mangan, natrium og sink. Innholdet av natrium var lavere enn påvisningsgrensen, og ble ekskludert fra de statistiske analysene. Resultater fra tre av forsøksstedene i Chile viste signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll for parameteren magnesium ( $p < 0,05$ ). Når det gjelder lokaliteten Quillota ble det funnet signifikante forskjeller for magnesium og fosfor ( $p < 0,05$ ). Verdiene for samtlige mineraler ligger imidlertid innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen og de toleranseintervallene som er målt med grunnlag i referansemaissorter fra Monsanto.

#### *Fettsyresammensetning*

Fettsyresammensetningen i MON 87460 er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Søkers dokumentasjon inneholder analyser av totalt 8 ulike fettsyrer. Med unntak av for palmitin (16:0)-, stearin (18:0)-, og gondoin (20:1)-syre, viser de kombinerte analysene ingen signifikante forskjeller mellom den transgene linjen og kontroll. For samtlige fettsyrer som er målt ligger nivåene innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen, og toleranseintervallene for referansesortene som inngikk i studien.

#### *Aminosyrer*

Aminosyreinnholdet er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Både essensielle og ikke-essensielle aminosyrer ble analysert. Statistiske analyser over samtlige lokaliteter i USA og tre lokaliteter i Chile viste ingen signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll for noen av aminosyrene. Når det gjelder lokaliteten Quillota ble det påvist signifikante forskjeller for parametrene alanin, aspergin, glutamin, isoleucin, leucin, lysin, fenylalanin og valin ( $p < 0,05$ ). For aminosyrene som er målt ligger imidlertid mengdene innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen, og toleranseintervallene for Monsanto referansesorter som inngikk i studien.

#### *Vitaminer*

Med unntak for vitamin A og C, er vitaminer målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Dokumentasjonen fra Monsanto inkluderer analyser av følgende parametre: B1, B2, B6, niacin, folinsyre og totalmengde vitamin E. Det er ikke funnet signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll for noen av vitaminene som er målt. Nivåene av vitaminene ligger også innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen og toleranseintervallene for Monsanto referansesorter. Sukkermais er ansett som en god kilde for vitamin A og C (Warman & Havard 1998), og står oppført i OECDs konsensusdokument.

#### *Sekundære metabolitter og antinæringsstoffer*

Sekundære metabolitter og antinæringsstoffer er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. I henhold til søker viser kombinerte analyser ingen statistisk 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 Monsanto referansesorter som inngikk i studien.

#### *Informasjon om stressrelaterte komponenter*

Med bakgrunn i at MON 87460 primært er tiltenkt dyrket i områder med redusert vanntilgang, har søker foretatt analyser av et utvalg sekundære metabolitter. Dette gjelder osmoregulanter som forskjellige sukkerarter (sukrose, glukose, fruktose), polyoler (sorbitol, mannitol, glycerol), fritt prolin, glycin, betain og kolin. I tillegg var metabolitter som generelt er assosiert med stressrespons, eksempelvis salicylsyre og abscisinsyre, inkludert i studien. Totalt ble det analysert for innhold av 11 ulike komponenter i fôr og maiskorn. Det er kun foretatt analyser av stressrelaterte komponenter i prøver fra de chilenske feltforsøkene. I henhold til søker ble sorbitol og mannitol fjernet fra de

statistiske analysene. Dette fordi over halvparten av analysene viste lavere verdier enn påvisningsgrensene for komponentene. Kombinerte statistiske analyser over tre av lokalitetene viser, med unntak av abscisinsyre og sukrose, ingen signifikante forskjeller mellom den transgene linjen og kontroll for parametrene som ble analyserte. Resultater fra lokaliteten Quillota viser imidlertid signifikante forskjeller ( $p < 0,05$ ) for parametrene fruktose og glukose i fôr, og abscisinsyre, glukose og fruktose i maiskorn.

Søker hevder at innholdet i mais er svært lavt for majoriteten av stressrelaterte komponenter og at det historisk sett ikke er knyttet til trygghetshendelser til disse metabolittene. Det hevdes også, med henvisning til publisert litteratur, at det ikke er ingen evidens i for at slike komponenter er unike for mais.

### 3.3. Agronomiske egenskaper

I henhold til søker er maislinjen MON 87460 evaluert med hensyn på agronomiske og morfologiske karakterer i sentrale dyrkingsområder for mais i USA og Chile. Forsøkene, som var lagt ut på totalt 31 lokaliteter i perioden 2006-2007, ble gjennomført med ulike vanningsregimer; dvs. rikelig vanntilgang, kunstig vanning i henhold til lokal dyrkingspraksis, samt redusert vanntilgang/tørkestress. I henhold til dokumentasjonen fra søker ble redusert vanntilgang definert som et aktuelt vanninnhold i jord på under 50 % av feltkapasiteten (dvs. jordas vanninnhold 2-3 dager etter vannmetting) under blomstring og mating av kornet (vekststadium V10 til R3). Det oppgis videre at aktuelt vanninnhold på forsøksruter med tilstrekkelig vanntilgang var  $\geq 50\%$  av feltkapasiteten under hele vekstsesongen. Forsøkene ble etablerte som enten randomiserte blokkdesign med tre gjentak per lokalitet, eller split-plot/ strip-plot design med 3-4 gjentak. Et varierende antall kommersielle maissorter ble benyttet som referansemateriale i forsøkene. I tillegg var det inkludert en umodifisert, nær-isogen maislinje som kontroll i hvert av forsøkene.

I hver av studiene ble det foretatt registreringer av til sammen 14 fenotypiske og agronomiske karakterer knyttet til reproduksjon, spredning og vegetativ vekst (tabell 6). I tillegg har søker gjort registreringer av resistens mot ulike skadegjørere (sjukdommer, insekter), samt toleranse mot en rekke abiotiske stressfaktorer som tørke, lave og høye temperaturer og salt (vekststadium V2-V6). Det er også gjort registreringer av spillplanter i felt og overlevelse utenfor dyrking.

#### Feltforsøk i USA 2006, 2007

Søkers dokumentasjon inkluderer resultater fra fem ulike feltstudier over to vekstsesonger i USA.

#### *Tilstrekkelig vanntilgang*

To feltforsøk ble etablert i 2006 og 2007 på henholdsvis 8 og 9 lokaliteter under forhold med tilstrekkelig vanntilgang. I henhold til søker ble de umodifiserte linjene H1548126 og DM1718 benyttet som kontroll i hvert av forsøksårene, mens henholdsvis 19 og 11 kommersielle hybridlinjer inngikk som referansesorter. Som forventet ved dyrking med tilstrekkelig vanning, ble det, med unntak av variabelen legde (rot) i 2006, ikke påvist signifikante forskjeller ( $p < 0,05$ ) mellom testlinje og kontroll for de undersøkte karakterene. Resultatene fra variansanalysen over steder vekstsesongen 2006 viste signifikant flere planter av testlinjen med legde sammenlignet med kontroll (5,6 vs. 1,5). Gjennomsnittverdien for denne parameteren var imidlertid innen variasjonsområdet for referansesortene som inngikk i forsøkene. Tilsvarende forskjeller ble ikke påvist i 2007.

#### *Lokale vanningsregimer*

Søker viser også til at det ble gjennomført feltforsøk på fem lokaliteter i USA vekstsesongen 2006, der vanningsregimet var i tråd med ordinær dyrkingspraksis i området. Resultatene fra variansanalysen over steder viste ingen signifikante forskjeller mellom testlinje og umodifisert kontroll for noen av de agronomiske og morfologiske karakterene som ble evaluert.

#### *Tørkestress og tilstrekkelig vanntilgang*

Vekstsesongen 2007 ble det etablert to feltforsøk i USA, der vanningsregimet inkluderte både rikelig og redusert vanntilgang. Det ble benyttet ulike forsøksdesign i forsøkene, noe som medførte at hvert forsøk ble analysert for seg.

I den ene studien ("Study 1") ble det etablert to forsøksfelt i henholdsvis California og Texas med split-plot design, med vanningsregime som hoved-plot og maislinje (test/kontroll/referansesort) som sub-plot. Vanningen ble foretatt ved at halvparten av hoved-plotene fikk tilstrekkelig vann til at plantene ga optimal frøavling. På de øvrige hoved-plotene ble maisplantene utsatte for tørkestress under siste del av den vegetative og begynnelsen av den reproduktive vekstfasen (ca V10 – R2). Forsøkene inkluderte foruten den transgene maislinjen, en umodifisert kontroll (DM1718) og 7 kommersielle referansesorter. Det ble ikke påvist signifikante forskjeller mellom testlinje og umodifisert kontroll for noen av de undersøkte karakterene, verken ved tilstrekkelig vanntilgang eller



ved tørkestress. MON 87460 har moderat tørketoleranse, og som forventet ble det registrert avlingsnedgang når plantene ble utsatte for tørkestress (14,3 t/ha vs. 11,8 t/ha). Den gjennomsnittlige avlingsforskjellen mellom MON 87460 og nær-isogen kontroll på 17 % var imidlertid ikke statistisk signifikant. Søker viser til stor variabilitet i avlingsrespons i forsøkene (standardfeil (SE)=17;  $p=0,287$ ), samt at kun to lokaliteter inngikk i de statistiske analysene.

En feltstudie ("Study 2") ble gjennomført på tre lokaliteter i 2007 (strip-plot design), med totalt 12 ulike referansesorter og DM1718 som konvensjonell kontroll. På grunn av nedbør på to av forsøksstedene under utviklingsstadiene V10-R3, ble forsøksruter med planter som skulle utsettes for tørkestress, ekskludert fra de statistiske analysene. Analysene av plot med tilstrekkelig vanning viste, med unntak av karakteren "andel grønt plantevev" (5,8 vs. 6,7), ingen signifikante forskjeller mellom MON 87460 og umodifisert kontroll for noen av fenotypiske karakterene som ble evaluert. Gjennomsnittverdien for denne parameteren var imidlertid innen variasjonsområdet for referansesortene som inngikk i forsøkene. Statistiske analyser av plot med tørkestressede planter på en lokalitet (Texas), viste med unntak av parameteren "andel grønt vev" (6,3 vs. 8,3), ingen signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll. Det ble videre målt en avlingsøkning på 35 % hos MON 87460 sammenlignet med umodifisert kontroll, men forskjellen var ikke signifikant (ikke tilstrekkelig statistisk styrke).

#### Feltforsøk i Chile 2006/2007

I henhold til søkers dokumentasjon ble det gjennomført et tilsvarende feltforsøk med MON 87460 på fire lokaliteter i Chile vekstsesongen 2006/2007. Feltforsøket ble etablert som et strip-plot design, med vanningsregime som hoved-plot og maislinje (test/kontroll/referansesort) som sub-plot, og inkluderte en umodifisert kontroll (DM1718) og 12 kommersielle hybridlinjer. Registreringer fra ett av forsøksstedene ble eliminert pga at jorda hadde for høyt vanninnhold under de kritiske utviklingsstadiene. Resultater fra variansanalysen over de resterende 3 lokalitetene viste, med unntak av frøavling, ingen signifikante forskjeller mellom testlinje og umodifisert kontroll for noen av de 14 agronomiske og morfologiske karakterene som ble evaluerte. MON 87460 ga signifikant høyere avling ( $p \leq 0,05$ ) sammenlignet med umodifisert kontroll (7,2 vs. 5,4 t/ha) når plantene ble utsatte for moderat tørkestress.

Søker viser også til at det er foretatt undersøkelser av den transgene maislinjen mhp toleranse overfor abiotiske stressfaktorer som tørke, lave og høye temperaturer og salt både i vekstkammer og veksthus. Det ble ikke påvist signifikante forskjeller mellom testlinjen MON 87460 og den umodifiserte, nær-isogene linjen for disse egenskapene. I en undersøkelse av forekomst av spillplanter av MON 87460 i USA, ble det ikke registrert spillplanter av mais verken etter høsting eller påfølgende vekstsesong.

### **3.4. Delkonklusjon**

Analyser av ernæringsmessige komponenter er i hovedsak utført i tråd med OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002). Det er påvist signifikante forskjeller mellom maislinje MON 87460 og kontroll i enkeltparametere. Verdier 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.

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

Faggruppen vektlegger at hoveddelen av maisforbruket i Norge er som dyrefôr og at mais til human konsum utgjør mindre enn 1 % av energiinntaket både for voksne og barn under ett år. Daglig inntak av sukkermais vil bidra med henholdsvis 0,1 % og 0,5 % av daglig anbefaling for vitamin A og C ved inntak lik medianen (data fra Den Norske mor barn studien). Ved maisinntak på 17,5 g/dag (97,5 % persentilen) for ungdom over 13 år vil om lag 2,1 % og 2,6 % av daglig anbefaling for henholdsvis vitamin A og vitamin C dekkes.

Når det gjelder dyrefôr ansees det naturlige vitamininnholdet i mais å være uten betydning da all mais som benyttes som fôr vitaminberikes i henhold til Mattilsynets anbefalinger. Tilsvarende angis krav til ernæringsmessig sammensetning av kornbasert barnemat i vedlegg 1 i Forskrift om bearbeidet kornbasert barnemat og annen barnemat til spedbarn og småbarn (FOR 2002-10-18 nr 1185). Faggruppen vurderer derfor at et eventuelt avvikende nivå av vitamin A og C i MON 87460 har liten ernæringsmessig betydning i Norge.

Med unntak for tørketoleranse viser feltforsøk ingen signifikante forskjeller mellom den transgene maislinjen MON 87460 og kontrollinjer med hensyn på agronomiske og morfologiske karakterer. Det ble ikke observert endringer i andre karakterer knyttet til vegetativ vekst, reproduksjon, fitness og persistens, som kan indikere økt selektiv fordel og økt sannsynlighet for spredning av den tørketolerante maislinjen utenfor dyrking.

**Tabell 6.** Fenotypiske og agronomiske karakterer, samt samspill med økologiske faktorer, som er evaluert i maislinjen MON 87460.

Evaluerte karakterer	Tidspunkt	Beskrivelse	
<b>Fenotypiske og agronomiske karakterer</b>	Frøkvile, Oppspiring	Etter 4, 7 og 12 dg	Prosent frø med: normal og abnormal spiring, harde frø (frøkvile), døde og levedyktige, svelte frø
	Frøplantevitalitet	V2-V4	Skala 1-9, alt. 0-9 (0=døde frø)
	Plantetetthet – vår	V2-V4	Antall spirte planter pr. forsøksrute
	Plantetetthet før høsting	Før høsting	Antall planter pr. forsøksrute
	Andel grønne planter	R6	Skala – andel grønt vev 2007: 1-9, der 1=90-100 % 2006: 0-9, der 9= 100 %
	Kolbehøyde	R6	Avstand fra plantebasis til nodium der kolben er festet
	Plantehøyde	R6	Avstand fra plantebasis til basis av flaggblad
	Legde - stengel	Før høsting	Antall knekte planter pr. rute
	Legde – rot	Før høsting	Antall bøydde planter >30°
	Tidlighet (antall dager til 50 % pollenspredning)	Pollenspredning	Antall dager fra planting til 50 % av plantene sprer pollen
	Tidlighet (antall dager til 50 % blomstring)	Blomstring	Antall dager fra planter til 50 % av plantene har eksponerte blomster.
	Spiredyktig pollen	Dannelse av hannblomster	Andel spiredyktig pollen
	Pollenmorfologi	Dannelse av hannblomster	Diameter av spiredyktige pollenkorn
	Vanninnhold i frø	Høsting	%
	Testvekt	Høsting	kg/bu
	Avling	Høsting	Tonn/ha v/15,5 % vanninnhold
	Tap av kolber	Før høsting	Antall modne kolber sluppet fra planten
	<b>Økologiske interaksjoner</b>	Insekt, sjukdom og abiotiske stressfaktorer	Varierende, fra planting til høsting
Overlevelse utenfor dyrking		Varierende, fra planting til høsting	Fenotypiske vurderinger inkl. plantetetthet, vitalitet, plantehøyde, antall kolber og frø pr. forsøksrute
Potensiale for etablering av spillplanter		Høst og påfølgende vår	Antall spillplanter pr. rute
Abiotisk stresstoleranse (tørke, kulde, varme, salt)		V2-V6	Forsøk veksthus og vekstkammer. Målinger ac bla høyde, vekststadium, vitalitet, klorofyllinnhold og biomasse.

## 4. Dokumentasjon av toksisitet og allergisitet

### 4.1. Toksisitet

#### *Akutt oral fôringsstudier på mus*

Monsanto har utført akutt oral fôringsstudier (sondefôring) på mus med renfremstilt CspB-protein produsert av *E. coli*. Studiene ble utført i henhold til GLP-retningslinjene fra EPA-OPPTS (870.1100) og EPA (40 CFR Part 160). To grupper á 10 hunnmus og 10 hannmus stamme Crl:CD-1(ICR), ble eksponert for henholdsvis 4,17 mg CspB-protein/kg kroppsvekt og 3,13 mg/kg kroppsvekt bovin serumalbumin (negativ kontroll). Valget av denne CspB-dosen er gjort fordi den representerer 3-4 ganger mer enn antatt generell CspB-eksponering for mennesker. Alle dyrene ble observert for kliniske tegn på forgiftning over en periode på 15 dager. Observasjonene ble foretatt to ganger daglig på arbeidsdager og en gang daglig i helger.

Ved avslutning av forsøket ble alle dyrene avlivet, og bukhule, toraks, samt en rekke organer og vev undersøkt makroskopisk. Det ble ikke påvist økt mortalitet eller toksiske effekter på dyrene som ble eksponert for CspB. NOEL ble satt til 4,17 mg CspB protein/kg kroppsvekt for CD-1 hann- og hunnmus.

I tillegg henviser søker til flere akutte orale fôringsstudier (sondefôring) på mus med renfremstilt NPTII-protein produsert av *E. coli*. Studiene er utført i henhold til GLP-retningslinjene fra EPA (40 CFR Part 160, 1989) og OECD Good Laboratory Practices (OECD 1998). Fôringsstudiene er dokumentert i søknader for flere av Monsanto's maislinjer.

#### *Fôringsforsøk på broiler*

Søknaden inneholder dokumentasjon fra et 42-dagers fôringsforsøk (Project No. MN-04-3) med hann- og hunnbroilere (Ross x Ross 308) (n = 100/gruppe, 50 % hann- and 50 % hunnfugler) i 42 dager. Studien ble utført i henhold til prinsippene for U.S. EPA FIFRA (21 CFR part 58) Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies. Forsøket omfattet 800 dyr, fordelt på åtte grupper á 100 dyr. Dyrene ble fôret med fôr som inneholdt henholdsvis 59 % mais som startfôr (dag 0 til dag 21) og slutfôr (dag 22 til dag 42), der 63 % av maisen bestod av henholdsvis MON 87460, en umodifisert kontrollsort (DM1718) og seks kommersielle, umodifiserte referansesorter. Fôret ble undersøkt for en rekke ernæringsmessige komponenter, mykotoksiner, mineraler og antinæringsstoffer. Det ble ikke foretatt målinger av nivået av NPTII- og CspB-proteiner. Følgende parametere ble undersøkt: mortalitet, vektøkning, fôreffektivitet, vekt av skrott, bryst, lår, vinger, og abdominalt fett, samt vann-, protein- og fettinnhold i bryst og lår (% av kroppsvekt til levende broilere). I henhold til søkers dokumentasjon er effekt av fôr/kjønn, analyse for hvert kjønn ved 5 % signifikansnivå og fôring med MON 87460 sammenlignet med kontroll og referansesortene undersøkt ved hjelp av variansanalyse (ANOVA). Søker hevder at det ble ikke påvist relevante biologiske endringer i de målte parametrene ved fôring med mais fra MON 87460 sammenlignet med kontroll og referansesorter. Det er imidlertid påvist samspill mellom kjønn og fôr for enkelte av de målte parametrene.

#### *Subkronisk fôringsforsøk på rotter*

Det er ikke blitt utført 28 dagers fôringsforsøk med hann- og hunnrotter med mais MON 87460. Søker henviser til at det er foretatt akutte orale fôringsstudier (sondefôring) på mus med renfremstilt CspB-protein og 13-ukers fôringsforsøk med rotter. Fôringsforsøkene ble utført av WIL Research Laboratories, LLC, 1407 George Road, Ashland, OH 44805-8946.

13 ukers fôringsforsøk (Study WIL-50342) ble utført med hann- og hunnrotter (stamme Crl:CD(SD)), 3 grupper á 20 rotter/kjønn. Studien (WIL-50342) ble utført i henhold til prinsippene til OECD guideline reference 408 (1998): Repeated dose 90 day oral toxicity study in rodents, samt OECDs Good Laboratory Practices og U.S. EPA FIFRA (40 CFR part 160) Good Laboratory Practice Standards.

Rottene ble akklimatiserte i 14 dager før fôringsforsøket, og var 6 uker gamle ved starten av fôringsforsøket. Vekt ble oppgitt til henholdsvis 185 til 240 g for hanner og 122 til 169 g for hunner. Dyrene ble individuelt merket med nummer på halen. Fôret bestod av 11 % og 33 % vekt/vekt maiskorn fra MON 87460 og 33 % nær-isogen mais (ikke navngitt). Fôret, som bestod av 11 % MON 87460, ble supplert med 22 % nær-isogen kontrollmais. Fôret ble undersøkt for en rekke komponenter av pesticider, mykotoksiner, ernæringsstoffer og antinæringsstoffer.

Kroppsvekt og fôrinntak ble målt på alle dyrene en gang per uke. Gjennomsnittlig inntak av MON 87460 i hver fôrgruppe med henholdsvis hannedyr og hunndyr var 7,8 og 23,6 g/kg kroppsvekt/dag og 9,4 og 28,2 g/kg kroppsvekt/dag. Det ble utført detaljerte kliniske undersøkelser, målinger av fôrinntak, makroskopiske og mikroskopiske undersøkelser av organene, samt klinisk patologisk undersøkelser av urin og blod fra 10 dyr i hver gruppe. Det ble påvist signifikante endringer i enkelte av de undersøkte parametrene. I serum fra hunnrotter ble det påvist signifikante større mengde alkaliskfosfatase hos 11 % fôrgruppen ( $p < 0,05$ ). Tilsvarende forskjeller ble imidlertid ikke påvist mellom kontroll og 33 %. Videre ble det funnet lavere innhold av natrium og aspartataminotransferase ( $p < 0,01$ ) i 33 %-gruppen sammenlignet med kontroll og 11 %-gruppen. Spesifikk vekt av urin hos hunnrotter var lavere i 11 % gruppen enn kontroll og 33 % ( $p < 0,05$ ). Undersøkelser av hjerte viste signifikant lavere absolutt vekt ( $p < 0,05$ ) hos hanner i 33 % gruppen sammenlignet med kontroll og 11 %-gruppen. Tilsvarende resultater ble funnet med hensyn på vekt relativt til hjernevekt ( $p < 0,05$ ). Hos hunndyrene ble det påvist signifikant lavere relativ vekt i forhold til kroppsvekt i 33 % gruppen ( $p < 0,05$ ) med hensyn på tyroid/paratyroid-vekt. Det ble imidlertid ikke funnet signifikante forskjeller med hensyn på absolutt vekt i 33 %-gruppen. For de øvrige parametre som ble undersøkt ble det ikke påvist statistisk signifikante forskjeller. Søker betrakter imidlertid de påviste forskjellene som ikke toksikologisk relevante. Dette fordi forskjellene kun ble detektert i enkelte fôrgrupper (forskjellig fôrgruppe for hann- og hunndyr), samt at de signifikante forskjellene som ble påvist ligger innenfor WIL Research Laboratories historiske data, som omfatter fra 560 til 685 rotter.

## 4.2. Allergenitet

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

Allergene proteiner i mat er ofte varme- og syrestabile. Matallergenene er oftest, men ikke alltid, stabile overfor mage- og tarmsafter. Allergene matproteiner er ofte de proteinene som forekommer i størst mengde i matvarer. Typiske mengder er fra 1-80 % av proteininnholdet. Konsentrasjonen av proteinene NPTII og CspB i korn er henholdsvis 0.000005 % og  $\approx 0.00007$  % av totalt proteininnhold i maiskorn, og utgjør således en svært liten del av det totale proteininnholdet. NPTII- og CspB-proteinene er testet i simulert mage- og tarmsaft, og proteinene brytes ned i løpet av ca. 30 sekunder. Det antas derfor at proteinene også brytes raskt ned i menneskets mage- og tarmkanal.

Basert på de testene som er omtalt, dvs. at NPTII- og CspB-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 %, anser faggruppen det som lite trolig at proteinene NPTII og CspB har større potensiale for å gi utvikling av matallergi hos mennesker enn det som umodifisert mais har.

Faggruppen konkluderer med at proteinene NPTII og CspB sannsynligvis ikke er mer allergene eller toksiske enn de respektive villtype-proteinene.

### 4.3. Delkonklusjon

CspB- og NPTII-proteinene som uttrykkes som følge av genmodifiseringen, har ingen likheter med kjente toksiner og allergener, eller egenskaper som tilsier at det vil virke som et allergen eller toksin. Innholdet av disse proteinene i korn er ca 0,01 % av totalt protein, og utgjør således en svært liten del av det totale proteininnholdet. Faggruppen finner det lite sannsynlig at eksponering av CspB- og NPTII-proteinene i seg selv og i de mengder som tilføres via genmodifisert mais er helsemessig betenkelig. En akutt fôringsstudie (oral sondefôring) på mus med bakterieframstilt CspB- og NPTII-protein viste ingen negative helseeffekter. Videre konkluderer ernæringsstudier med broilere at maislinjen MON 87460 er ernæringsmessig lik umodifisert mais. Det er imidlertid uklart om det er inkludert materiale fra tørkestressede planter i fôringsforsøkene.

Resultater fra et sub-kronisk fôringsforsøk på rotter viser statistisk signifikante forskjeller mellom fôrgruppene med hensyn på enkeltparametre. Søker betrakter de påviste forskjellene som ikke toksikologiske relevante. Dette fordi forskjellene kun ble detektert i enkelte fôrgrupper (forskjellig fôrgruppe for hann- og hunndyr), samt at de statistisk signifikante forskjellene som ble påvist ligger innenfor WIL Research Laboratories historiske data, som omfatter fra 560 til 685 rotter.

## 5. Miljørisikovurdering

Monsanto søknad om godkjenning av maislinjen MON 87460 under EU forordning 1829/2003/EF omfatter bruksområdene fôrvarer, næringsmidler, import og prosessering. Søknaden gjelder ikke dyrking. Miljørisikovurderingen av de transgene maislinjene er derfor avgrenset til mulige effekter av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport og prosessering til mat, fôr og ulike industrielle formål. I tillegg vil indirekte eksponering gjennom gjødsel fra husdyr fôret med genmodifisert mais representere en mulig kilde til uønsket genspredning.

### 5.1. Potensiale for utilsiktede effekter på fitness relatert til genmodifiseringen

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

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

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

Overlevelse og spredning av mais til andre habitater i Europa er imidlertid hovedsakelig begrenset av dårlig konkurranseevne, manglende frøkvile, mottagelighet for sykdom og liten toleranse for lave temperaturer. Undersøkelsene av fenotypiske karakterer som er foretatt av søker viser ingen forskjeller mellom den insektresistente maislinjen og konvensjonelle sorter med tilsvarende genetisk bakgrunn for disse karakterene. Det er ingen indikasjoner på at den introduserte egenskapen hos MON 87460 vil medføre økt fitness, og økt evne til overvintring eller etablering av ugraspopulasjoner utenfor dyrkingsmiljø i forhold til konvensjonelle maissorter.

### 5.2. Potensiale for genoverføring

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

### 5.2.1 Horisontal genoverføring

*NptIII*-genet flankeres av *loxP*-seter hentet fra bakteriofagen P1. *LoxP* er et gjenkjenningssete for rekombinasen Cre, som finnes i ulike bakteriearter (for eksempel enterobakterier) infisert med bakteriofagen P1. Det kan ikke utelukkes at ulike enterobakterier, som er en kjent vert for infeksjon med P1 (og beslektede) bakteriofager, vil ha en høyere sannsynlighet for å rekombinere med og derav integrere *loxP*-flankerte transgener, eksempelvis *nptIII*-genet.

#### *Mulig opptak i bakterier.*

Data fra tilgjengelige eksperimentelle studier viser at genoverføring fra transgene planter til bakterier inntreffer svært sjelden under naturlige forhold, og at denne overføringen, i fravær av sete-spesifikke rekombinasjonsmekanismer, forutsetter høy sekvenslikhet mellom overført DNA og bakteriens eget genom (EFSA 2004, 2009a; VKM 2005, Simpson *et al.* 2007). Dagens vitenskapelige forståelse av barrierer for naturlig genoverføring mellom ubeslektede arter og flere års forskning for om mulig å framprovosere tilfeldig overføring av genetisk materiale fra planter til mikroorganismer tilsier at slike prosesser skjer svært sjelden (Kay *et al.* 2002; Tepfer *et al.* 2003, Thomas & Nielsen 2005).

Nielsen *et al.* (2000) og De Vries & Wackernagel (2002) har eksempelvis undersøkt persistens av DNA og opptak av rekombinant plante-DNA i jordbakterier. I disse laboratoriebaserte forsøkene ble det påvist svært små mengder DNA som var tatt opp av bakterier. Forutsetningen for at slik horisontal genoverføring kunne skje var tilstedeværelse av DNA-sekvenshomologi mellom plantetransgenet og mottagerbakterien. I hvilken grad tilfeldig sekvenshomologi mellom plantetransgener og naturlig forekommende bakterier finnes er usikkert. Mange plantetransgener inneholder imidlertid rekombinerte DNA-sekvenser hentet fra naturlig forekommende jordbakterier (Bensasson *et al.* 2004). De tidligere eksperimentelle og publiserte studiene som har undersøkt muligheten for horisontal overføring fra rekombinante planter har vært basert på tilfeldig eller innsatt DNA sekvenslikhet mellom transgenene og de eksponerte bakteriegenomene (se oppdatert oversikt i EFSA 2009a). Det har imidlertid blitt påpekt store metodologiske utfordringer ved en slik påvisning, slik at det i dag er usikkert om manglende deteksjon er grunnet fravær av overføring, manglende sensitive metoder for påvisning eller feil tidshorisont for prøvetaking (Heinemann & Traavik 2004; Nielsen & Townsend 2004).

Risikovurderingene av ARMG som er utført av EFSA (2009a) og VKM (2005) har ikke vurdert genoverføringspotensiale for ARM gener som er flankert av bakterielle rekombinasjonsseter. I hvilken grad de tidligere publiserte studiene (se EFSA 2009b) er representative for å forstå sannsynligheten for horisontal overføring av transgener flankert med *loxP*-rekombinasjonsseter er uklart. *LoxP* er et gjenkjenningssete for rekombinasen Cre, som finnes i ulike bakteriearter (eksempelvis enterobakterier) infisert med bakteriofagen P1 (Hoess *et al.* 1982). Bakterier infisert med P1-bakteriofagen (og beslektede bakteriofager) kan derfor antas å ha en høyere sannsynlighet for å rekombinere med transgener som har flankerende *loxP*-seter. Cre/*lox* systemer er generelt kjent for å ha høy rekombinasjons-effektivitet. Bakteriofagen P1 er vidt utbredt (Jensen *et al.* 1998) og er påvist i en rekke ulike bakteriearter som finnes i mage-tarmkanalen hos mennesker, husdyr og i miljøet (e.g. *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Erwinia*) (Goldberg *et al.* 1974, Ornellas & Stocker 1974; Breitbart *et al.* 2002; Yamolinsky 2004; Balding *et al.* 2005; Hazen *et al.*, 2007).

I tillegg er flere endogene *Lox (B)*-rekombinasjonsseter kjent i ulike bakterier som også kan fungere som et substrat for Cre-rekombinasen. Det er også kjent at andre sekvenser med mindre DNA-similaritet til *loxP* kan fungere som gjenkjenningssete for Cre-rekombinasen i andre organismer (Thyagarajan *et al.* 2000; Sauer *et al.* 1992, 1996; Corneille *et al.* 2003). Forekomst, distribusjon, sekvensspesifisitet og effektivitet av ulike typer Cre rekombinasen og rekombinasjonsseter i ulike bakteriegenom er lite kjent (Kaiser & Dworking 1975; Hileman *et al.* 2006; Sheren *et al.* 2007).



Det foreligger ingen eksperimentelle studier som har sett på mulig økt opptaksfrekvens av *loxP*-flankerte ARM-gener i bakterier, ei heller vurderinger av hvilken overføringsfrekvens/rate, sted, og bakterieart/stamme for rekombinasjon som vil være klinisk relevant i denne sammenhengen. I fravær av eksperimentelle data er derfor vurderingen basert på en generell forståelse av rekombinasjonsbarrierer i bakterier (kvalitativ vurdering av mulig endret rekombinasjonsrate) og effekt (i forhold til kvantitativ dokumentert prevalens av ARM motpart i eksponerte miljø, eller kvalitative vurderinger ved mangel på R-gen prevalensdata).

Effekten av en lav, men signifikant horisontal overføring av *nptII*-genet til bakterier i mage-tarmkanalen vil avhenge av hvorvidt transformantene har selektive fordeler. Ved mangel på seleksjonspress i fordøyelseskanal og/eller miljøet, er sannsynligheten for at horisontal genoverføring av transgener vil gi selektive fordeler (økt fitness) til mikroorganismer svært liten (Nielsen 2003; Pettersen *et al.* 2005). Aminoglykosidet neomycin, som *nptII*-genet gir resistens mot, benyttes imidlertid i veterinærmedisin i Norge. Et seleksjonstrykk på bakterietransformanter kan derfor ikke utelukkes. Effekten av en horisontal overføring av *nptII*-genet vil også avhenge av andre naturlig forkommende kilder til *nptII*-genet i Norge. Kunnskap om forekomsten av *nptII*-genet i miljøet er imidlertid mangelfull. De tilgjengelige data tilsier at forekomsten av *nptII*-genet i patogene bakterier i Norge er lav. Antibiotikaene som *nptII* gir resistens imot er klassifisert av European Medicines Agency (EMA 2007) og WHO (2005) som "critically important" og "cannot be classified as of no or minor therapeutic relevance".

Som for all DNA som skal fra planter til tarmbakterier gjelder at noe DNA ødelegges under prosessering av mat (avhengig av matvare). Mesteparten av plante-DNA tygges ned av nukleaser fra bukspyttkjertelen. Eventuelle rester vil prinsipielt kunne tas opp av naturlig kompetente celler. Inne i bakteriecellene vil fremmed DNA stort sett tygges ned av restiksjonsenzymer pga forskjeller i metyleringsmønster på planteDNA og vertsDNA. For å integreres i genomet trenges en rekombinasjon, denne er oftest illegitim og sjelden, eller krever homologe sekvenser på flere 100 bp (usikkerhet på krav til størrelse fra *recA*). Om en vertscelle inneholder *Lox*-seter og uttrykker Cre-rekombinasen er det i prinsippet mulig at DNA kan kuttes ut fra innkommende DNA og settes inn i vertskromosomet. Dette vil eventuelt skje i celler som allerede er infisert med bakteriofag P1 (denne er temperat), og dermed har Cre/*lox* systemet. Avgjørende er imidlertid om det er seleksjonspress til stede, og om en eventuell transformant vil få noen selektiv fordel. Det er imidlertid mange svært usannsynlige hendelser som skal følge etter hverandre her. Det antas derfor at hyppigheten at slike hendelser er neglisjerbar i forhold til spredning av *nptII*-genet fra tarmbakterier som allerede har dette genet.

#### *Mulig opptak via GIT*

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.

## 5.2.2 Vertikal genoverføring

Potensialet for krysspollinering mellom maislinje MON 87460 og konvensjonelt foredlede 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.

Økt tørketoleranse kan bare betraktes å være en selektiv fordel på arealer der plantenes utsettes for tørkestress. Dette er imidlertid ikke en egenskap som vil representere økt sannsynlighet for spredning av mais i Europa. Overlevelse hos mais er i hovedsak begrenset av liten frosttoleranse, dårlig konkurransevne, manglende frøkvile og mottagelighet for soppsjukdommer. Som for konvensjonelle sorter er det ingenting som tilsier at eventuelle spillplanter vil overleve til neste vekstsesong eller etablere uønskede populasjoner i Norge.

Tatt i betraktning tiltenkt bruksområde for 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, annekse 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/NL/2009/70 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 føret med genmodifisert mais representere en mulig kilde til uønsket genspredning. Miljørisikovurderingen som er presentert av søker identifiserer ingen endret risiko for miljø i forhold til annen mais. Syngenta har derfor ikke utarbeidet spesifikke strategier for risikohåndtering eller en særskilt plan for overvåking av MON 87460.

Tatt i betraktning tiltenkt bruksområde for MON 87460 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 MON 87460 for import og prosessering, og omfatter ikke dyrking. Med bakgrunn i tiltenkt bruksområde er miljørisikovurderingen avgrenset til mulige effekter av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport og prosessering, samt indirekte eksponering gjennom gjødsel fra husdyr føret 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. Risiko for utkryssing med dyrkede sorter vurderes til å være neglisjerbar.

De tilgjengelige data viser at forekomsten av *nptII*-genet i patogene bakterier i Norge er lav. Kunnskap om forekomsten av *nptII*-genet i miljøet er imidlertid mangelfull. Den veterinære bruken i Europa, inkludert i Norge, av aminoglykosider, som kanamycin og neomycin, er slik at disse kan gi selektive betingelser for bakterietransformanter som har tatt opp ARMG.

Flertallet i faggruppen konkluderer med bakgrunn i rapportene (EFSA 2004, 2009a; VKM 2005) at bidraget av *nptII*-genet fra mat og fôr produsert fra MON 87460 ikke er en signifikant kilde til resistensgener i bakterier som lever i tarmen til mennesker og dyr som spiser mat og fôr fra MON 87460. Det bemerkes at neomycin benyttes i norsk veterinærmedisin i behandling av enteritt hos gris. Forbruket i 2006 av neomycin var 29 kg virkestoff, mens det totale forbruket av antibiotika til landdyr i Norge var på ca 6,5 tonn virkestoff (NORM/NORM-VET 2006).

Det er kunnskapshull knyttet til forekomsten av *nptII*-genet i Norge og Europa. Den store geografiske forskjellen i resistensmønster i Europa er ikke vurdert i dette tilfelle. Kanamycin/neomycin-resistens i Norge er beskrevet hos blant annet *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* og *Staphylococcus intermedius* fra svin, svinefaeces, kalkunfaeces, storfekjøtt, hund og hundefaeces. Forekomsten av resistente isolater varierer mellom 1 til 10 % (Normvet rapportene 2004-2007). Hvilke resistensgener som forårsaker resistensen er ikke beskrevet.

Et mindretall i faggruppen (K.M. Nielsen, A. Myhr, T. Bøhn, O. Stabbetorp) påpeker store forskjeller i geografisk utbredelse av antibiotikaresistens i Europa, og at det mangler publisert dokumentasjon som viser forekomsten av *nptII*-genet i Norge. I fravær av vitenskaplig dokumentasjon antas resistensgenforekomsten å være lav. Videre påpekes det at neomycin benyttes i norsk landbruk, og at et seleksjonstrykk på eventuelle sjeldne transformanter derfor ikke kan utelukkes. Antibiotikaene som genet gir resistens imot er klassifisert av European Medicines Agency (EMA 2007) og WHO (2005) som "critically important". *NptII*-genet flankeres av *lox*- seter hentet fra bakteriofagen P1. *LoxP* er et rekombinasjonssete for enzymet Cre. Det kan ikke utelukkes at ulike enterobakterier som er infisert med P1 (og beslektede) bakteriofager vil ha en høyere sannsynlighet for å gjenkjenne disse setene, rekombinere med og derav integrere *nptII*-genet. P1 bakteriofagen er påvist i en rekke ulike bakteriearter som finnes i mage-tarmkanalen hos mennesker og husdyr. Tidligere risikovurderinger av ARMG utført av EFSA (2009a) og VKM (2005) har ikke vurdert genoverføringspotensiale for transgener som er flankert av bakterielle rekombinasjonsseter. Manglende datagrunnlag for prevalens av *nptII*-genet i Norge, samt sannsynlig økt rekombinasjon i eksponerte bakterier (P1 infektete), gjør at mindretallet ikke ønsker å konkludere med hensyn på risiko knyttet til bruk av *nptII*-genet som antibiotikaresistensmarkørgen.

## 6. Vurdering av søkers dokumentasjon

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

### FG3s innspill til EFSA-net 28.04.10 til søknad EFSA/GMO/NL/2009/70

#### C.03

The *nptII* expression cassette in maize line MON 87460 contains the coding sequence of the *npt II* gene from *E. coli*, which is flanked by two functional *loxP* sites. The *loxP* recombination site is recognized by the P1 bacteriophage Cre recombinase.

The Cre/*loxP* site-specific recombination system has been applied in various plant species for marker gene removal, and according to the applicant the *lox-P* sites in MON 87460 were inserted to facilitate the potential excision of the *nptII* cassette, specifically using Cre recombinase. However, referring to the lack of safety concerns around the NPTII protein, the applicant concludes that it was unnecessary to excise the *nptII* gene using the *loxP* sites that flank this gene. The applicant is therefore asked to clarify why the *loxP* sites have been added to MON 87460.

#### D.01

The ability of MON87460 to tolerate drought stress is conferred by expression of the *cspB* gene from *B. subtilis*. CspB belongs to the bacterial cold shock protein (CSP) family, which is a group of small proteins characterised by the presence of a highly conserved RNA-binding sequence identified as cold shock domain (CSD). According to the applicant, the CspB protein is suggested to function as a "RNA-chaperone". CSPs recognize single stranded polynucleotides without apparent sequence specificity and facilitate the initiation of translation by destabilizing non-productive secondary structures in mRNA under environmental stress.

Since the exact mechanism of drought tolerance in MON87460 maize remains to be defined, and due to the apparent absence of binding sequence specificity indicating that plant CSD-containing proteins could be involved in a more general response to stress by binding RNAs, we would like the applicant to discuss the possibility that other physiological processes in the plant may be affected by the expression of the *cspB* gene.

#### D.06

The microbial flora in the gastrointestinal tract of cattle may contain bacteria harbouring the bacteriophage P1 and the Cre-recombinase. Aminoglycoside antibiotics are to some extent used to treat gastrointestinal infection in cattle, and therefore the presence of these antibiotics will make a selective pressure which will facilitate a transfer of the *nptII* cassette to gastrointestinal bacteria.

Since the *lox* sites and intervening sequences are present in the GM variety, the putative horizontal spread of the transgenes in the intervening sequence has to be evaluated.

#### D.07.08

In reference to 7.8.4, 7.10.2, MSL0021408-2008 and WI-2007-064 the objective of the 42-days study and the 90 days study was to evaluate the nutritional value and potential health effects of broiler and rats fed diets containing processed corn grain from MON 87460 compared to grain from a conventional control variety. However, it is not evident from the dossier whether corn from MON 87460 plants exposed to stress conditions has been used in these studies. The Norwegian GMO Panel

is of the opinion that the 42 days broiler study and the 90 days rat study also should include feed with grain from MON 87460 plants produced under water-limited conditions.

The applicant is also asked to clarify why the acute toxicity test in mice (with pure protein) has been carried out with a low protein dose (4.7 mg/kg bodyweight). According to the OECD guideline 401 "Acute oral toxicity", a limit test at one dose level of at least 2000 mg/kg bodyweight may be carried out. The Norwegian GMO Panel is of the opinion that the applicant, in order to exclude any acute health effects of CspB protein, should have performed an acute toxicity test on mice with at least 2000 mg/kg bodyweight with purified CspB protein.

## KONKLUSJON

Analysen av ernæringsmessige komponenter er i hovedsak utført i tråd med OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002). Det er påvist signifikante forskjeller mellom maislinje MON 87460 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.

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

Faggruppen vektlegger at hoveddelen av maisforbruket i Norge er som dyrefôr og at mais til humant konsum utgjør mindre enn 1 % av energiinntaket både for voksne og barn under ett år. Daglig inntak av sukkermais vil bidra med henholdsvis 0,1 % og 0,5 % av daglig anbefaling for vitamin A og C ved inntak lik medianen (data fra Den Norske mor barn studien). Ved maisinntak på 17,5 g/dag (97,5 % persentilen) for ungdom over 13 år vil om lag 2,1 % og 2,6 % av daglig anbefaling for henholdsvis vitamin A og vitamin C dekkes.

Når det gjelder dyrefôr ansees det naturlige vitamininnholdet i mais å være uten betydning da all mais som benyttes som fôr vitaminberikes i henhold til Mattilsynets anbefalinger. Tilsvarende angis krav til ernæringsmessig sammensetning av kornbasert barnemat i vedlegg 1 i Forskrift om bearbeidet kornbasert barnemat og annen barnemat til spedbarn og småbarn (FOR 2002-10-18 nr 1185). Faggruppen vurderer derfor at et eventuelt avvikende nivå av vitamin A og C i MON 87460 har liten ernæringsmessig betydning i Norge.

Med unntak for tørketoleranse viser feltforsøk ingen signifikante forskjeller mellom den transgene maislinjen MON 87460 og kontrollinjer med hensyn på agronomiske og morfologiske karakterer. Det ble ikke observert endringer i andre karakterer knyttet til vegetativ vekst, reproduksjon, fitness og persistens, som kan indikere økt selektiv fordel og økt sannsynlighet for spredning av den tørketolerante maislinjen utenfor dyrking.

CspB- og NPTII- proteinet, som uttrykkes som følge av genmodifiseringen, har ingen likheter med kjente toksiner og allergener, eller egenskaper som tilsier at det vil virke som et allergen eller toksin. Innholdet av disse proteinene i korn er ca 0,00007 % av totalt protein, og utgjør således en svært liten del av det totale proteininnholdet. Faggruppen finner det lite sannsynlig at eksponering av CspB- og NPTII-proteinet i seg selv og i de mengder som tilføres via genmodifisert mais er helsemessig betenkelig. En akutt føringstudie (oral sondeføring) på mus med bakterieframstilt CspB- og NPTII-protein viser ingen skadelige helseeffekter. Videre konkluderer ernæringsstudier med broilere at maislinjen MON 87460 er ernæringsmessig lik umodifisert mais. Resultater fra et sub-kronisk føringforsøk på rotter viser statistisk signifikante forskjeller mellom fôr-gruppene med hensyn på enkeltparametre. Søker betrakter de påviste forskjellene som ikke toksikologisk relevant. Dette fordi forskjellene kun ble detekterte i enkelte fôrgrupper (forskjellig fôrgruppe for hann- og hunndyr). I tillegg vises det til at de statistisk signifikante forskjellene som ble påvist ligger innenfor WIL Research Laboratories historiske data, som omfatter fra 560 til 685 rotter.

Det innsatte *nptIII*-genet koder for resistens mot enkelte aminoglykosider som benyttes i norsk landbruk (VKM 2005). De tilgjengelige data viser at forekomsten av *nptIII*-genet i patogene bakterier i Norge er lav. Kunnskap om forekomsten av *nptIII*-genet i miljøet er imidlertid mangelfull.

Flertallet i faggruppen konkluderer med at tilstedeværelse av *nptIII*-gener i mat og fôr produsert fra den genmodifiserte maisen MON 87460 ikke er en signifikant kilde til *nptIII*-gener i bakterier som lever i menneskets og dyrs tarmsystem, sammenlignet med de *nptIII*-genene som allerede er tilstede i bakteriepopulasjonen i tarmen.

Et mindretall i faggruppen (K. M. Nielsen, A. Myhr, T. Bøhn, O. Stabbetorp) påpeker store forskjeller i geografisk utbredelse av antibiotikaresistens i Europa, og at det mangler publisert dokumentasjon på forekomsten av *nptIII*-genet i Norge. I fravær av vitenskaplig dokumentasjon, antas resistensgenforekomsten å være lav. Det påpekes at neomycin benyttes i norsk landbruk, og at et seleksjonstrykk på eventuelle sjeldne transformanter derfor ikke kan utelukkes. Antibiotikaene som genet gir resistens imot er klassifisert av European Medicines Agency (EMA 2007) og WHO (2005) som "critically important". *NptIII*-genet flankeres av *loxP*-seter hentet fra bakteriofagen P1. *LoxP* er et rekombinasjonssete for enzymet Cre. Det kan ikke utelukkes at ulike Enterobakterier som er infektert med P1 (og beslektede) bakteriofager vil ha en høyere sannsynlighet for å gjenkjenne disse setene, rekombinere med og derav integrere *nptIII*-genet. P1-bakteriofagen er påvist i en rekke ulike bakteriearter som finnes i mage-tarmkanalen hos mennesker og husdyr. Tidligere risikovurderinger av ARMG utført av EFSA (2009a) og VKM (2005) har ikke vurdert genoverføringspotensiale for transgener som er flankert av bakterielle rekombinasjonsseter. Manglende datagrunnlag for prevalens av *nptIII*-genet i Norge, samt sannsynlig økt rekombinasjon i eksponerte bakterier (P1-infektete) gjør at mindretallet ikke ønsker å konkludere med hensyn på risiko knyttet til bruk av *nptIII*-genet som antibiotikaresistensmarkørgen.

Søknaden gjelder godkjenning av maislinjen MON 87460 for import og videreprosessering. I tillegg har faggruppen vurdert bruk av maishybriden som næringsmiddel og fôrvarer. Faggruppen har imidlertid ikke vurdert mulige helse- og 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, dyrkingsomfanget er svært begrenset og det er ingen stedegne eller introduserte viltvoksende arter som mais kan hybridisere med. Risiko for utkryssing med dyrkede sorter vurderes til å være neglisjerbar.

## REFERANSER

- Agbios (2010). Agbios GM Database. Information on GM Approved Products.  
<http://www.agbios.com/dbase.php>
- Ambreski, K., Hoess, R. (1984). Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J. Biol. Chemistry*, **259**, 1509-1514.
- Balding, C., Bromley, S.A., Pickup, R.W., Saunders, J.R. (2005). Diversity of phage integrases in Enterobacteriaceae: development of markers for environmental analysis of temperate phages. *Environ. Microbiol.*, **7**, 1558-1567.
- Bensasson, D., Boore, J.L. & Nielsen, K.M. (2004). Genes without frontiers. *Heredity*, **92**, 483-489.
- Breitbart, M., Salamon, P., Andresen, B., Mahaffy, J.M., Segall, A.M., Mead, D., Azam, F., Rohwer, F. (2002). Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **22**, 14250-14255.
- Castiglioni, P., Warner, D., Bensen, R.J., Anstrom, D.C., Harrison, J., Stoecker, M., Abad, M., Kumar, G., Salvador, S., D'Ordine, R., Navarro, S., Back, S., Luethy, M.H. & Heard, J.E. (2008). Bacterial RNA chaperones confer abiotisk stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions. *Plant Physiology*, **147**, 446-455.
- 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.
- Corneille, S., Lutz, K.A., Azhagiri, A.K., Maliga, P. (2003). Identification of functional lox sites in the plastid genome. *The Plant J.*, **35**, 753-762.
- de Vries, J., Meier, P. and Wackernagel, W. (2001). The natural transformation of the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter* sp. by transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, **195**, 211- 215.
- 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](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](http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_guidance/660.html)
- EFSA (2009a). Use of Antibiotic Resistance Genes as Marker Genes in Genetically Modified Plants. Scientific Opinion of the Panel on Genetically Modified Organisms (GMO) and the Panel on Biologically Hazards (BIOHAZ). *The EFSA Journal*, **1034**: 1-82.
- EFSA (2009b). Consolidated presentation of the joint Scientific Opinion of the GMO and BIOHAZ Panels on the "Use of Antibiotic Resistance Genes as Marker Genes in Genetically Modified Plants" and the Scientific Opinion of the GMO Panel on "Consequences of the Opinion on the Use of Antibiotic Resistance Genes as Marker Genes in Genetically Modified Plants on



- Previous EFSA Assessments of Individual GM Plants. *The EFSA Journal*, **1108**, 1-8. [http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa\\_locale-1178620753812\\_1211902604575.htm](http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1211902604575.htm)
- EMEA (2007). European Medicines Agency – Committee for medicinal products for veterinary use and committee for medicinal products for human use (2007). *Presence of the antibiotic resistance marker gene nptII in plant for food and feed uses*. EMEA/CVMP756937/2007, 22 Feb. 2007.
- 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>)
- Fuchs, R. L., Heeren, R. A., Gustafson, M. E., Rogan, G. J., D.E., B., Leimgruber, R.M., Finn, R. F., Herselman, A. & Berberich, S. A. (1993). Purification and characterisation of microbially neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein and its equivalence to the plant expressed protein. *Bio/Technology*, **11**, 1537-1542.
- Goldberg, R.B., Bender, R.A., Streicher, S.L. 1974. Direct selection for P1-sensitive mutants of enteric bacteria. *J. Bacteriol.*, **118**, 810-814.
- Graumann, P. (1997). A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis and low temperature. *Molecular Microbiology*, **25**, 741-752.
- Hallauer, A.R. (2000). Potential for outcrossing and weediness of genetically modified insect protected corn. APHIS-USDA.
- Hazen, T.H., Dongying, W., Eisen, J.A., Sobecky, P.A. 2007. Sequence characterization and comparative analysis of three plasmids isolated from environmental *Vibrio* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **23**, 7703-7710.
- Heinemann, J.A. & Traavik, T. (2004). Problems in monitoring horizontal gene transfer in field trials of transgenic plants. *Nature Biotechnology*, **22**: 1105-1109.
- Hileman, R.E., Bonner, H.K., Kaempfe, T.A., Hammond, B.G., Glenn, K.C. (2006). Safety assessment of cre recombinase. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 8640-8647.
- Hoess, R.H., Abremski, K. (1984). Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **81**, 1026-1029.
- Hoess, R.H., Ziese, M., Sternberg, N. (1982). P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **79**, 3398-3402.
- Jensen, E.C., Schrader, H.S., Rieland, B., Thompson, T.L., Lee, K.W., Nickerson, K.W., Kokjohn, T.A. (1998). Prevalence of broad-host-range lytic bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 575-580.
- Kaiser D, Dworking, M. (1975). Genetic transfer to *Myxobacterium* by *Escherichia coli* phage P1. *Science*, **187**, 653-654.

- Kay, E., Vogel, T.M., Bertolla, F., Nalin, R. and Simonet P., (2002). *In situ* transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 3345-3351.
- 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.
- Nielsen, K. M. & Townsend, J. P. (2004). Monitoring and modeling horizontal gene transfer. *Nature Biotechnology*, **22**, 1110-1114. See also correspondence vol 22, 1349-1350.
- NORM/NORM-VET (2006). *Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway*. Tromsø/Oslo 2007. ISSN: 1502-2307. <http://www.vetinst.no>
- OECD (1998). OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. Number 1. ENV/MC/CHEM (98)17. [http://www.olis.oecd.org/olis/1998doc.nsf/LinkTo/NT00000C5A/\\$FILE/01E88455.PDF](http://www.olis.oecd.org/olis/1998doc.nsf/LinkTo/NT00000C5A/$FILE/01E88455.PDF)
- OECD (2002). Consensus Document on Compositional Consideration for New Varieties of Maize (*Zea Mays*): key Food and Feed Nutrients, Anti-nutrients and Secondary Plant Metabolites, No. 6, series on Safety of Novel Foods and Feeds.
- OECD (2003). Consensus Document on the biology of *Zea mays* subsp. *Mays* (Maize). *Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology (ENV/JM/MONO, No. 27*, 1-49.
- Ornellas, E.P., Stocker, B.A.D. (1974). Relation of lipopolysaccharide character to P1 sensitivity in *Salmonella typhimurium*. *Virology*, **60**, 491-502.
- Pettersen, A. K. Primicero, R., Bøhn, T. & Nielsen, K. M. (2005). Modelling suggest frequency estimates are not informative for predicting the long-term effect of horizontal gene transfer in bacteria. *Environmental Biosafety Research*, **4**, 222-233.
- Sauer, B. (1992). Identification of cryptic lox sites in the yeast genome by selection for Cre-mediated chromosome translocations that confer multiple drug resistance. *J. Mol. Biol.*, **223**, 911-913.
- Sauer, B. (1996). Multiplex cre/lox recombination permits selective site-specific DNA targeting to both a natural and an engineered site in the yeast genome. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 4608-4613.
- 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.

- Sheren, J., Langer, S.J., Leinwand, L.A. (2007). A randomized library approach to identifying functional lox site domains for the Cre recombinase. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 5464-5473.
- Simpson, D.J., Dawson, L.F., Fry, J.C., Rogers, H.J. and Day, M.J. (2007). Influence of flanking homology insert size on the transformation frequency of *Acinetobacter baylyi* BD413. *Environ. Biosafety Res.*, **6**, 55-69.
- 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.
- Tepfer, D., Garcia-Gonzales, R., Mansouri, H., Seruga, M., Message, B., Leach, F. and Perica, M.C., (2003). Homology-dependent DNA transfer from plants to a soil bacterium under laboratory conditions: implications in evolution and horizontal gene transfer. *Transgenic Res.*, **12**, 425-437.
- Thomas, C.M. & Nielsen, K.M. (2005). Mechanisms and barriers to horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiol.*, **3**, 711-721.
- Thyagarajan, B., Guimaraes, MJ, Groth, AC, Calos, MP. (2000). Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene*, **244**, 47-54.
- US EPA 40 CFR PART 160. USA Environmental Protection Agency Good Laboratory Practices - 40 CFR Part 160  
<http://www.epa.gov/compliance/monitoring/programs/fifra/glp.html>
- U.S. FDA (1994). Secondary food additives permitted in food for human consumption; food additives permitted in feed and drinking water of animals; aminoglycoside 3'-phosphotransferase II; Final Rule. *Federal Register*, **59**, 26700-26711.
- van Wijk, F. & Knippels, L. (2007) Initiating mechanisms of food allergy: oral tolerance versus allergic sensitization,. *Biomed. Pharmacother.*, **61**, 8–20.
- 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.
- Warman, P.R. & Havard, K.A. (1998). Yield, vitamin and mineral contents of organically and conventionally grown potatoes and sweet corn. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **68(3)**: 207–216.
- WHO (2005). World Health Organisation. *Critically important antimicrobial agents for human medicine for risk management strategies of non-human use*. Report of a WHO working group consultation, 15-18 Feb. 2005, Canberra, Australia.
- Yarmolinsky, M.B. (2004). Bacteriophage P1 in retrospect and in prospect. *J. Bacteriol.*, **186**, 7025-7028.

## VEDLEGG 1

### Cre/lox- rekombinasjonssystemet

Sete-spesifikk rekombinasjon gjør det mulig med presise modifiseringer av plantegenomet, både i forbindelse med grunnleggende studier og i anvendt forskning. Det er etablert flere ulike sete-spesifikke rekombinasjonssystemer i planter, og blant disse er bakteriofag P1 Cre/lox-systemet benyttet i en rekke arter. Proteinet Cre-rekombinase, som uttrykkes av *cre*-genet, medierer en sete-spesifikk rekombinasjon mellom de to *LoxP*-setene ATAACTTCGTATA- GCATACAT-TATACGAAGTTAT på 34 basepar (bp) (Hoess & Abremski 1985). Hvert *LoxP*-sete (locus of X-over P1) på bakteriofag P1 består av en asymmetrisk sekvens på 8 bp mellom to palindromic-flankesekvenser på 13 bp.

Cre/lox-systemet ble først beskrevet i bakteriofager (Hoess & Abremski 1985), og er basert på sete-spesifikk rekombinasjon ved hjelp av *Cre*. Sete-spesifikke rekombinaser er proteiner som bindes til bestemte DNA- målsekvenser, og reaksjonen krever ikke krever ingen kofaktorer. Cre-rekombinase er en Type I topoisomerase, som katalyserer en sete-spesifikk rekombinasjon av DNA mellom to *loxP*-seter (locus of X-over P1). *LoxP*-sekvensen inneholder distinkte bindingssteder for Cre-rekombinase, som omslutter en rettet kjernesekvens, der rekombinasjonen og rearrangeringen skjer. Hos celler, som inneholder *loxP*-seter og uttrykker Cre-rekombinase, vil det derfor skje en rekombinasjon. Dobbeltrådet DNA kuttet ved begge *loxP*-setene ved hjelp av Cre-rekombinase, etterfulgt av rearrangering og liggering ("scissors and glue") (Bucholtz 2008).

Det Cre/lox-setespesifikke rekombinasjonssystemet er benyttet i flere ulike plantearter for eliminering av markørgener, "gene targeting" og funksjonell genomikk (Dale & Ow 1991; Vega *et al.* 2008). Cre/lox-systemet blir vanligvis brukt til å generere markørfrie planter ved hjelp av sete-spesifikk rekombinase, men systemet er også blitt benyttet til kontrollerte integreringer av transgener i genomer (Srivastava *et al.* 2004). I tillegg er det foreslått en kombinert metode basert på bruk av to sete-spesifikke rekombinasjonssystemer: en for integrering av DNA og en for å fjerne sekvenser som ikke har noen funksjon etter DNA-overføring ved hjelp av Cre/lox, FLP-FRT og R-RS induserbare systemer (Srivastava & Ow 2004). Siden Cre/lox-systemet ble utviklet er det blitt benyttet for å utvikle markørfrie transgene planter i en rekke arter, inkludert tobakk (Kopertekh *et al.* 2004; Wang *et al.* 2005), *Arabidopsis* (Zuo *et al.* 2001), mais (Zhang *et al.* 2003; Kebrach *et al.* 2005), ris (Hoa *et al.* 2002; Sreekala *et al.* 2005), soya (Li *et al.* 2007), potet (Cuellar *et al.* 2006) og tomat (Zhang *et al.* 2006).

Wang *et al.* (2005) har konstruert en binær ekspresjonsvektor med Cre/lox-systemet med formål å eliminere både markørgenet og *cre* fra den transgene planten ved hjelp av auto-utkutting. I denne vektoren er både rekombinasegenet *cre* under kontroll av "heat shock"-promotoren, og markørgenet *nptII* under kontroll av *CaMV35S*- promotoren plassert mellom de to *loxP*-setene i direkte orientering. Det aktuelle/ønskede genet var plassert på utsiden av *loxP*-setene. Ved hjelp av denne vektoren og varmebehandling ble både *cre*- og *nptII*-genene eliminert fra de fleste av de regenererte plantene. Det ønskede genet forble integrert i genomet og viste stabil nedarving.

Så langt er det i de fleste tilfeller benyttet en konstitutiv promotor for å uttrykke rekombinasegenet. Dette til tross for at et induserbart eller regulert system kan generere nye og bedre muligheter. Det er vist rekombinasjonseffektiviteter på 100 % når ekspresjonen av *cre* ble regulert av *CLAVATA3*-promotoren. I tillegg ble det, ved bruk av fire utviklingsregulerte promotorer, observert betydelig mindre variasjon i rekombinasjonsfrekvens sammenlignet med bruk av *35S*-promotoren (Van Ex *et al.* 2009).

Sekvensstørrelsen, dvs. lengden av sekvensen mellom *lox*-setene, er av betydning når det kommer til effektivitet og evne til å eliminere DNA-fragmentet mellom *LoxP*-setene. I henhold til Coppoolse *et*

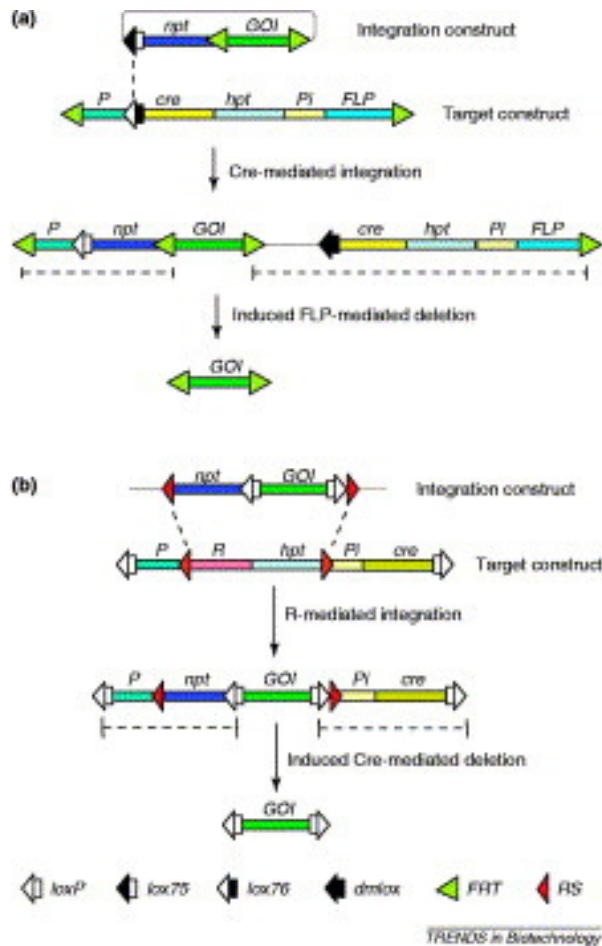
*al.* (2005) ser 55 kb til å være en rasjonell grense i tomat, selv om sekvenser opp til 200 kb er funnet eliminert.

Kotransformering kan utføres ved hjelp av en vektor som inneholder *cre* og en vektor som inneholder *lox*-seter. *Lox*-setene er orientert i samme retning og omslutter seleksjonsmarkøren, mens det aktuelle, interessante genet er lokalisert på utsiden av *lox*-setene. Ved hjelp av en frøspesifikk promotor som kontrollerer *cre*-genet vil disse transgene linjene generere frø og 2. generasjonsplanter uten markører (Kopertekh *et al.* 2010).

### **Kombinert bruk av Cre/lox-systemet for å oppnå både sete-rettet genintegrasjon og påfølgende eliminering av uønskede transgener**

Målrettet integrering er et generelt mål for å oppnå reproducerbare transformasjonsresultater og konsistente uttrykk av transgener. Dette kan kombineres med påfølgende rekombinasjon for å deletere uønskede transgener etter at de har utført sin funksjon. Endelig vil en iduserbar aktivering av systemet være ideelt for å kontrollere aktiviteter og timing av hendelsene. Målrettet integrering er utført ved hjelp av transformering med partikkelbombardering, polyetylenglykol og *Agrobacterium* (Srivastava *et al.* 2004; Srivastava & Ow 2004, inkl. referanser). Alternative sete-rettede integrasjonshendelser er blitt utnyttet for å målrette integreringen for deretter å fjerne de uønskede transgenene, eksempelvis *HSP-FLP* (Lyznik *et al.* 1995), *HSP-cre* (Zhang *et al.* 2003), *XVE-cre* (Zuo *et al.* 2001) og *GST-R* (Sugita *et al.* 2000).

I figur 1 er det vist et eksempel der den inverterte, rekombinerte sekvensen fremmer resiprok rekombinasjon og utveksling av det transgene konstruert med en allerede integrert sekvens (Srivastava & Ow 2004). Videre vil de tandem-orienterte sekvensene (f.eks. *LoxP*-seter) deletere sekvensen mellom setene. Dette vi generere en GMO med bare det ønskede genet integrert.



**Figur 1.** Kombinert strategi basert på bruk av to sete-spesifikke systemer til å fjerne uønsket DNA etter sete-spesifikk integrering.

- (a) Bruk av *Cre/lox* for å integrere sirkulært DNA, etterfulgt av bruk av induserbare FLP–*FRT* system for å eliminere unødvendig DNA fra integrasjonslokus (understreket i figuren med striplet linje). Avlevering av sirkulært DNA inneholdende et *lox75*-sete ("left arm mutant") i celler inneholdende et *lox76*-lokus ("right arm mutant") resulterer i sete-spesifikk integrering av aktuelt gen (*goi*) og dannelse av en et dobbelt mutant *lox*-sete (*dmlox*) som stabiliserer det integrerte lokuset. Etter at den sete-spesifikke integrasjonslinjen er identifisert er *FLP*-genet indusert for å fjerne unødvendig DNA.
- (b) Bruk av R-*RS*-systemet for å integrere en lineær T-DNA fra *Agrobacterium*, inn i målrettede *RS*-seter. Dette etterfølges av det induserbare *Cre/lox*-systemet for å fjerne unødvendig/overflødig DNA fra integrasjonslokuset.
- hpt*, hygromycin phosphotransferase gene; *npt*, neomycin phosphotransferase; *P*, promotor; *P<sub>i</sub>*, induserbar promotor. Terminatorer eller promoterer for *goi* eller *hpt* er ikke vist. (Kilde: Srivastava & Ow 2004)

## Cre/lox-systemet og muligheten for horisontal genspredning

Hensikten med å benytte Cre/lox-systemet under utviklingen av en genmodifisert sort er at sekvenser som flankeres av *Lox*-setene kan fjernes før kommersialisering. Dette innebærer at *Lox*-seter er satt inn for å eliminere temporære gener som selektive markørgener, *Cre*-genet og andre midlertidig, introduserte transgener. Ved å benytte rekombinasjonssystemet sammen med målrettet genintegrering, vil det ikke være *Lox*-seter i sluttproduktet som teoretisk øke rekombinasjonen med mikroorganismer og medføre mulig uønsket horisontal genspredning. Ved denne bruken av systemet vil horisontal genspredning bare være en problemstilling i forbindelse med framstillingen av GMO-sorten. Hvis *Lox*-setene og mellomliggende sekvenser er til stede i GM-sorten ved kommersialisering må det imidlertid vurderes om dette kan medføre økt horisontal spredning av mellomliggende transgener. I slike tilfeller vil det være avgjørende hvilke gener det gjelder og deres respektive forekomster i naturen.

### Mulig opptak i bakterier

*NptII*-genet i MON 87460 flankeres av *loxP*-seter hentet fra bakteriofagen P1. *LoxP* er et gjenkjenningsete for rekombinasjonen Cre som finnes i ulike bakteriearter (for eksempel enterobakterier) infisert med bakteriofagen P1. Det kan ikke utelukkes at ulike enterobakterier som er kjent vært for infeksjon med P1 (og beslektede) bakteriofager vil ha en høyere sannsynlighet for å rekombinere med og derav integrere *nptII*-genet.

Data fra tilgjengelige eksperimentelle studier viser at genoverføring fra transgene planter til bakterier inntreffer svært sjelden under naturlige forhold, og at denne overføringen, i fravær av sete-spesifikke rekombinasjonsmekanismer, forutsetter høy sekvenslikhet mellom overført DNA og bakteriens eget genom (EFSA 2004, 2009a; VKM 2005, Simpson *et al.* 2007). Dagens vitenskapelige forståelse av barrierer for naturlig genoverføring mellom ubeslektede arter og flere års forskning for om mulig å framprovosere tilfeldig overføring av genetisk materiale fra planter til mikroorganismer tilsier at slike prosesser skjer svært sjelden (Kay *et al.* 2002; Tepfer *et al.* 2003, Thomas & Nielsen 2005).

Nielsen *et al.* (2000) og De Vries & Wackernagel (2002) har eksempelvis undersøkt persistens av DNA og opptak av rekombinant plante-DNA i jordbakterier. I disse laboratoriebaserede forsøkene ble det påvist svært små mengder DNA som var tatt opp av bakterier. Forutsetningen for at slik horisontal genoverføring kunne skje var tilstedeværelse av DNA-sekvenshomologi mellom plantetransgenet og mottagerbakterien. I hvilken grad tilfeldig sekvenshomologi mellom plantetransgener og naturlig forekommende bakterier finnes er usikkert. Mange plantetransgener inneholder imidlertid rekombinerte DNA-sekvenser hentet fra naturlig forekommende jordbakterier (Bensasson *et al.* 2004). De tidligere eksperimentelle og publiserte studiene som har undersøkt muligheten for horisontal overføring fra rekombinante planter har vært basert på tilfeldig eller innsatt DNA sekvenslikhet mellom transgenene og de eksponerte bakteriegenomene (se oppdatert oversikt i EFSA 2009a). Det har imidlertid blitt påpekt store metodologiske utfordringer ved en slik påvisning, slik at det i dag er usikkert om manglende deteksjon er grunnet fravær av overføring, manglende sensitive metoder for påvisning eller feil tidshorisont for prøvetaking (Heinemann & Traavik 2004; Nielsen & Townsend 2004).

Risikovurderingene av ARMG som er utført av EFSA (2009a) og VKM (2005) har ikke vurdert genoverføringspotensiale for ARM gener som er flankert av bakterielle rekombinasjonsseter. I hvilken grad de tidligere publiserte studiene (se EFSA 2009b) er representative for å forstå sannsynligheten for horisontal overføring av transgener flankert med *loxP*-rekombinasjonsseter er uklart. *LoxP* er et gjenkjenningsete for rekombinasjonen Cre, som finnes i ulike bakteriearter (eksempelvis enterobakterier) infisert med bakteriofagen P1 (Hoess *et al.* 1982). Bakterier infisert med P1-bakteriofagen (og beslektede bakteriofager) kan derfor antas å ha en høyere sannsynlighet for å rekombinere med transgener som har flankerende *loxP*-seter. Cre/lox systemer er generelt kjent for å ha høy rekombinasjonseffektivitet. Bakteriofagen P1 er vidt utbredt (Jensen *et al.* 1998) og er påvist i en rekke ulike bakteriearter som finnes i mage-tarmkanalen hos mennesker, husdyr og i miljøet (e.g.

*Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Erwinia*) (Goldberg *et al.* 1974, Ornellas & Stocker 1974; Breitbart *et al.* 2002; Yamolinsky 2004; Balding *et al.* 2005; Hazen *et al.*, 2007).

I tillegg er flere endogene *Lox (B)*-rekombinasjonssteder kjent i ulike bakterier som også kan fungere som et substrat for Cre-rekombinasen. Det er også kjent at andre sekvenser med mindre DNA-similaritet til loxP kan fungere som gjenkjenningssete for Cre-rekombinaser i andre organismer (Thyagarajan *et al.* 2000; Sauer *et al.* 1992, 1996; Corneille *et al.* 2003). Forekomst, distribusjon, sekvensspesifisitet og effektivitet av ulike typer Cre rekombinaser og rekombinasjonssteder i ulike bakteriegenerom er lite kjent (Kaiser & Dworking 1975; Hileman *et al.* 2006; Sheren *et al.* 2007).

Det foreligger ingen eksperimentelle studier som har sett på mulig økt opptaksfrekvens av loxP-flankerte ARM-gener i bakterier, ei heller vurderinger av hvilken overføringsfrekvens/rate, sted, og bakterieart/stamme for rekombinasjon som vil være klinisk relevant i denne sammenhengen. I fravær av eksperimentelle data er derfor vurderingen basert på en generell forståelse av rekombinasjonsbarrierer i bakterier (kvalitativ vurdering av mulig endret rekombinasjonsrate) og effekt (i forhold til kvantitativ dokumentert prevalens av ARM motpart i eksponerte miljø, eller kvalitative vurderinger ved mangel på R-gen prevalensdata).



## REFERANSER

- Ambreski, K. & Hoess, R. (1984). Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J. Biol. Chemistry*, **259**, 1509-1514.
- Balding, C., Bromley, S.A., Pickup, R.W. & Saunders, J.R. (2005). Diversity of phage integrases in Enterobacteriaceae: development of markers for environmental analysis of temperate phages. *Environ. Microbiol.*, **7**, 1558-1567.
- Bensasson, D., Boore, J.L. & Nielsen, K.M. (2004). Genes without frontiers. *Heredity*, **92**, 483-489.
- Breitbart, M., Salamon, P., Andresen, B., Mahaffy, J.M., Segall, A.M., Mead, D., Azam, F. & Rohwer, F. (2002). Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **22**, 14250-14255.
- Bucholtz, F. (2008) Principles of site-specific recombinase (SSR) technology. *J Vis Exp*:718.
- Coppoolse, E.R., de Vroomen, M.J., van Gennip, F., Hersmus, B.J. & van Haaren, M.J. (2005). Size does matter: cre-mediated somatic deletion efficiency depends on the distance between the target lox-sites. *Plant Mol Biol*, 687-98.
- Corneille, S., Lutz, K.A., Azhagiri, A.K. & Maliga, P. (2003). Identification of functional lox sites in the plastid genome. *The Plant J.*, **35**, 753-762.
- Cuellar, W., Gaudin, A., Solorzano, D., Casas, A., Nopo, L., Chudalayandi, P., Medrano, G., Kreuze & J., Ghislain, M. (2006). Self-excision of the antibiotic resistance gene nptII using a heat inducible Cre-loxP system from transgenic potato. *Plant Mol Biol*, **32**, 71-82
- Dale, E.C. & Ow, D.W. (1990). Intra and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. *Gene*, **91**, 79-85.
- De Vries, J., Meier, P. & Wackernagel, W. (2001). The natural transformation of the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter* sp. by transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, **195**, 211- 215.
- 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](http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_opinions/384.html)
- EFSA (2009a). Use of Antibiotic Resistance Genes as Marker Genes in Genetically Modified Plants. Scientific Opinion of the Panel on Genetically Modified Organisms (GMO) and the Panel on Biologically Hazards (BIOHAZ). *The EFSA Journal*, **1034**: 1-82.
- EFSA (2009b). Consolidated presentation of the joint Scientific Opinion of the GMO and BIOHAZ Panels on the “Use of Antibiotic Resistance Genes as Marker Genes in Genetically Modified Plants” and the Scientific Opinion of the GMO Panel on “Consequences of the Opinion on the Use of Antibiotic Resistance Genes as Marker Genes in Genetically Modified Plants on Previous EFSA Assessments of Individual GM Plants. *The EFSA Journal*, **1108**, 1-8. [http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa\\_locale-1178620753812\\_1211902604575.htm](http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1211902604575.htm)
- Goldberg, R.B., Bender, R.A. & Streicher, S.L. (1974). Direct selection for P1-sensitive mutants of enteric bacteria. *J. Bacteriol.* **118**, 810-814

- Hazen, T.H., Dongying, W., Eisen, J.A., Sobecky, P.A. (2007). Sequence characterization and comparative analysis of three plasmids isolated from environmental *Vibrio* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **23**, 7703-7710.
- Heinemann, J.A. & Traavik, T. (2004). Problems in monitoring horizontal gene transfer in field trials of transgenic plants. *Nature Biotechnology*, **22**: 1105-1109.
- Hileman, R.E., Bonner, H.K., Kaempfe, T.A., Hammond, B.G. & Glenn, K.C. (2006). Safety assessment of cre recombinase. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 8640-8647.
- Hoa, TTC., Bong, BB., Huq, E., Hodges, T.K. (2002). Cre-lox site-specific recombination controls the excision of a transgene from the rice genome. *Theor Appl Genet*, **104**, 518-525.
- Hoess, R.H. & Abremski, K. (1984). Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **81**, 1026-1029.
- Hoess, R.H. & Abremski, K. (1985). Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system. *J. Mol. Biol.*, **181**, 351-362
- Hoess, R.H., Ziese, M. & Sternberg, N. (1982). P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **79**, 3398-3402.
- Jensen, E.C., Schrader, H.S., Rieland, B., Thompson, T.L., Lee, K.W., Nickerson, K.W. & Kokjohn, T.A. (1998). Prevalence of broad-host-range lytic bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 575-580.
- Kaiser D. & Dworking, M. (1975). Genetic transfer to Myxobacterium by *Escherichia coli* phage P1. *Science*, **187**, 653-654.
- Kay, E., Vogel, T.M., Bertolla, F., Nalin, R. & Simonet P. (2002). In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 3345-3351.
- Kebrach, S., Lörz, H. & Becker, D. (2005). Site-specific recombination in *Zea mays*. *Theor Appl Genet*, **111**, 1608-1616.
- Keese, P. (2008). Risks from GMOs due to horizontal gene transfer. *Environ. Biosafety Res.*, **7**, 123-149.
- Kopertekh, L., Schulze, K., Frolov, A., Strack, D., Broer, I. & Schiemann, J. (2010). Cre-mediated seed-specific transgene excision in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 597-605.
- Kopertekh, L., Jüttner, G. & Schiemann, J. (2004). PVX-Cre-mediated marker gene elimination from transgenic plants. *Plant Mol. Biol.*, **55**, 491-500.
- Li, Z., Xing, A., Moon, B.P., Burgoyne, S.A., Guida, A.D., Liang, H., Lee, C., Caster, C.S., Barton, J.E., Klein, T.M. & Falco, S.C. (2007). A Cre/loxP mediated self-activating gene excision system to produce marker gene free transgenic soybean plants. *Plant Mol. Biol.*, **65**, 329-341.
- Lyznik, L.A., Hirayama, L., Rao, K.V., Abad, A. & Hodges, T.K. (1995). Heat-inducible expression of FLP gene in maize cells. *Plant J.*: 177-186.
- 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. & Townsend, J. P. (2004). Monitoring and modeling horizontal gene transfer. *Nature Biotechnology*, **22**, 1110-1114. See also correspondence vol 22, 1349-1350.
- Ornellas, E.P. & Stocker, B.A.D. (1974). Relation of lipopolysaccharide character to P1 sensitivity in *Salmonella typhimurium*. *Virology*, **60**, 491-502.
- Sauer, B. (1992). Identification of cryptic lox sites in the yeast genome by selection for Cre-mediated chromosome translocations that confer multiple drug resistance. *J. Mol. Biol.* **223**, 911-913.
- Sauer, B. (1996). Multiplex cre/lox recombination permits selective site-specific DNA targeting to both a natural and an engineered site in the yeast genome. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 4608-4613.
- Sheren, J., Langer, S.J. & Leinwand, L.A. (2007). A randomized library approach to identifying functional lox site domains for the Cre recombinase. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 5464-5473.
- Simpson, D.J., Dawson, L.F., Fry, J.C., Rogers, H.J. & Day, M.J. (2007). Influence of flanking homology insert size on the transformation frequency of *Acinetobacter baylyi* BD413. *Environ. Biosafety Res.* **6**, 55-69.
- Sreekala, C., Wu, L., Gu Wang, D. & Tian, D. (2005). Excision of a selectable marker in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) using a chemically regulated Cre-loxP system. *Plant Cell Rep.*, **24**, 86-94.
- Srivastava, V., Ariza-Nieto, M. & Wilson, A.J. (2004). Cre-mediated site-specific gene integration for consistent transgene expression in rice. *Plant Biotechnol. J.*, 169-79 (kun abstrakt tilgjengelig).
- Srivastava, V. & Ow, D.W. (2004). Marker-free site-specific gene integration in plants. *Trends Biotechnology*: 627-629.
- Sugita, K., Kasahara, T., Matsunaga, E. & Ebinuma, H. (2000). A transformation vector for the production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency. *Plant J.*, 461-469
- Tepfer, D., Garcia-Gonzales, R., Mansouri, H., Seruga, M., Message, B., Leach, F. & Perica, M.C., (2003). Homology-dependent DNA transfer from plants to a soil bacterium under laboratory conditions: implications in evolution and horizontal gene transfer. *Transgenic Res.*, **12**, 425-437.
- Thomas, C.M. & Nielsen, K.M. (2005). Mechanisms and barriers to horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiol.*, **3**, 711-721.
- Thyagarajan, B., Guimaraes, M.J., Groth, A.C. & Calos, M.P. (2000). Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene*, **244**, 47-54.
- Van Ex, F., Verweire, D., Claeys, M., Depicker, A. & Angenon, G. (2009). Evaluation of seven promoters to achieve germline directed Cre-lox recombination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.*, 1509-20.

- Vega, J.M., Yu, W., Han, F., Kato, A., Peters, E.M., Zhang, Z.J. & Birchler, J.A. (2008). Agrobacterium-mediated transformation of maize (*Zea mays*) with Cre-lox site specific recombination cassettes in BIBAC vectors. *Plan Mol Biol*, 587-98.
- 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.
- Wang, Y., Chen, B., Hu, Y., Li, J. & Lin, Z. (2005). Inducible excision of selectable marker gene from transgenic plants by the cre/lox site-specific recombination system. *Transgenic Res.*, 605-14.
- Yarmolinsky, M.B. (2004). Bacteriophage P1 in retrospect and in prospect. *J. Bacteriol.*, **186**, 7025-7028.
- Zhang, W., Subbarao, S., Addae, P., Shen, A., Armstrong, C., Peshke, V. & Gilbert, L. (2003). Cre-lox-mediated marker gene excision in transgenic maize (*Zea mays* L.) plants. *Theor. Appl. Genet.*, **107**, 1157–1168.
- Zhang, Y., Li, H., Ouyang, B., Lu, Y. & Ye, Z. (2006). Chemical-induced autoexcision of selectable markers in elite tomato plants transformed with a gene conferring resistance to lepidopteran insects. *Biotechnol. Lett.*, **28**, 1247–1253.
- Zuo, J., Niu, Q-W., Moller, S.G. & Chua, N.-H. (2001). Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants. *Nat. Biotechnol.*, **19**, 157–161