



VKM Report 2016: 18

Endelig helse og miljørisikovurdering av genmodifisert maishybrid MON 863 x MON 810 x NK 603

**Helse- og miljørisikovurdering av insektsresistent og herbicidtolerant
genmodifisert maishybrid MON 863 x MON 810 x NK 603 til mat, fôr, import og
prosessering under forordning 1829/2003/EF (EFSA/GMO/UK/2004/07)**

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

Rapport fra Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM) 2016: 18

Endelig helse og miljørisikovurdering av genmodifisert maishybrid MON 863 x MON 810 x NK 603.

Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet
21.04.2016

ISBN: 978-82-8259-208-6

Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM)

Postboks 4404 Nydalen

N – 0403 Oslo

Telefon: 21 62 28 00

Epost: vkm@vkm.no

www.vkm.no

www.english.vkm.no

Nøkkelord : Mais, *Zea mays* L., genmodifisert maishybrid MON 863 x MON 810 NK 603, EFSA/GMO/UK /2004/07, insektresistens, herbicidtoleranse, glyfosat, Cry3Bb1, NPTII, CP4-EPSPS, helse og miljørisiko, forordning 1829/2003/EF, direktiv 2001/18/EF VKM (2013) ISBN: 978-82-8259-208-6, Oslo, Norge. Endelig helse og miljørisikovurdering, Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet

Bidragstere

Den som utfører arbeid for VKM, enten som oppnevnt medlem 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:

Åshild Andreassen (leder), Per Brandtzæg, Askild Holck, Olavi Junntila, Heidi Sjursen
Konestabo, Richard Meadow, Kåre M. Nielsen, Hilde-Gunn Hoen-Sorteberg, Rose Vikse

Koordinatorer fra sekretariatet

Merethe Aasmo Finne, Ville Erling Sipinen

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	6
Forkortelser og ordforklaringer	11
Bakgrunn.....	15
Oppdrag fra Mattilsynet	16
Risikovurdering	18
1 Innledning.....	18
2 Molekylær karakterisering	20
2.1 Hybridproduksjon.....	20
2.2 Evaluering av foreldrelinjer	21
2.2.1 Foreldrelinje MON 863	21
2.2.2 Foreldrelinje MON 810	25
2.2.3 Foreldrelinje NK 603	28
2.2.4 Hybriden MON 863 x MON 810 x NK 603.....	32
2.3 Konklusjon	34
3 Komparative analyser	35
3.1 Valg av komparator og forsøksdesign	35
3.1.1 Analyser av ernæringsmessige komponenter	35
3.2 Agronomiske karakterer.....	38
3.3 Konklusjon	38
4 Helserisikovurdering	39
4.1 Produktbeskrivelse og tiltenkte bruksområder.....	39
4.2 Effekt av prosessering	39
4.3 Toksikologi.....	39
4.3.1 Toksikologisk vurdering av de uttrykte proteinene NPTII, CP4 EPSPS, Cry1Ab og Cry3Bb1	39
4.3.1.1 Degradering av NPTII, CP4 EPSPS, Cry1Ab og Cry3Bb1 i fordøyelsesvæske. 39	
4.3.1.2 Akutt oral toksisitet.....	40
4.3.2 Toksikologisk vurdering av MON 863 x MON 810 x NK 603 i hel mat/fôr.....	40
4.3.2.1 Fôringforsøk med rotter:.....	40
4.4 Allergenitet	40
4.4.1 Vurdering av allergene egenskaper til NPTII, CP4 EPSPS, Cry1Ab og Cry3Bb1	40
4.4.2 Adjuvans (fremming av immunreaksjon mot andre stoffer)	41
4.5 Ernæringsmessig vurdering.....	41

4.5.1	Fôringsforsøk på broiler:	41
4.6	Konklusjon	42
5	Miljørisikovurdering	43
5.1	Potensiale for utilsiktede effekter på fitness relatert til genmodifiseringen	43
5.2	Potensiale for genoverføring	44
5.2.1	Horisontal genoverføring (HGT)	44
5.2.2	Vertikal genoverføring.....	46
5.3	Potensiale for samspill mellom GMP og målorganismer	47
5.4	Potensiale for samspill mellom GMP og ikke-målorganismer	47
5.5	Konklusjon	48
6	Kunnskapshull.....	49
7	Konklusjoner.....	50
8	Referanser.....	53

Sammendrag

I forbindelse med forberedelse til implementering av forordning 1829/2003 i norsk rett har Miljødirektoratet bedt Mattilsynet om vurderinger av alle genmodifiserte organismer (GMOer) og avledete produkter som inneholder eller består av GMOer som er godkjent under forordning 1829/2003 eller direktiv 2001/18, og som er godkjent for ett eller flere bruksområder som omfattes av genteknologiloven. På den bakgrunnen har Mattilsynet, i brev av 13. februar 2013 (ref. 2012/150202), bedt Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM) om å utarbeide endelige vitenskapelige risikovurderinger av 39 GMOer og avledete produkter som inneholder eller består av genmodifiserte organismer, innen Mattilsynets sektoransvar. VKM er bedt om endelige risikovurderinger for de EU-godkjente søknader hvor VKM ikke har avgitt endelig risikovurdering. I tillegg er VKM bedt om å vurdere hvorvidt det er nødvendig med oppdatering eller annen endring av de endelige risikovurderingene som VKM tidligere har levert.

Den genmodifiserte maishybriden MON 863 x MON 810 x NK 603 fra Monsanto Company ble godkjent i EU til import, videreforedling og bruk som mat og fôr under forordning 1829/2003 i 2010 (søknad EFSA/GMO/UK/2004/07). I forbindelse med EFSA's offentlige høring av søknaden, vurderte VKM maishybriden med hensyn på mulig helserisiko i 2005 (VKM 2005a).

Helse- og miljørisikovurderingen av MON 863 x MON 810 x NK 603 er basert på søkers dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSA's GMO Extranet, og uavhengige vitenskapelige publikasjoner. Vurderingen er gjort i henhold til tiltenkt bruk i EU/EØS-området, og i overensstemmelse med kravene i genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven. Videre er kravene i forordning 1829/2003/EF, utsettingsdirektiv 2001/18/EF (vedlegg 2,3 og 3B) og veiledende notat til Annex II (2002/623/EF), samt prinsippene i EFSA's retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter og avledete næringsmidler (EFSA 2006, 2010, 2011) og Organisasjonen for økonomisk samarbeid og utvikling (OECD) konsensusdokumenter for mais (OECD 2002, 2003) lagt til grunn for vurderingen.

Den vitenskapelige risikovurderingen av MON 863 x MON 810 x NK 603 omfatter molekylær karakterisering av transformasjonsprosessen, vektorkonstruksjonen(e), genuttrykk, nedarving og stabilitet av transgenene, komparative analyser av agronomiske og fenotypiske egenskaper, næringsmessige vurderinger, toksikologi og allergenisitet, utilsiktede effekter, potensialet for genoverføring, fitness, effekter på målorganismer og ikke-målorganismer og biogeokjemiske prosesser.

Det presiseres at VKMs mandat ikke omfatter vurderinger av etikk, bærekraft og samfunnsnytte, i henhold til kravene i den norske genteknologiloven og dens konsekvensutredningsforskrift. Disse aspektene blir derfor ikke vurdert av VKMs faggruppe for genmodifiserte organismer.

Maishybridene MON 863 x MON 810 x NK 603 er resultat av konvensjonelle kryssinger mellom foreldrelinjene MON 863, MON 810 og NK 603.

Foreldrelinje MON 863 er produsert ved biolistisk transformasjon av den innavlete maislinjen A634, og inneholder et modifisert *cry3Bb1*-gen fra jordbakterien *B. thuringiensis* subsp. *kumamotoensis*. Cry3Bb1-proteinet som uttrykkes gir plantene toleranse mot angrep fra arter i billeslekten *Diabrotica*. Maislinjen inneholder også antibiotikaresistensmarkørgenet *nptII*, som uttrykker resistens mot aminoglykosider som kanamycin og neomycin.

Foreldrelinje MON 810 inneholder genet *cry1Ab* fra bakterien *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-1. Genet koder for et δ -endotoksin som gir resistens mot enkelte skadeinsekter i ordenen Lepidoptera, eksempelvis maispyralide (*Ostrinia nubilalis*) og enkelte arter i slekten *Sesamia*.

Foreldrelinje NK 603 uttrykker CP4-EPSPS-proteiner, som er resultat av introduksjon av *cp4-epsps*-genet fra jordbakterien *Agrobacterium tumefaciens*. Genet koder for enzymet 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfatsyntetase, som omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfat, en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. I motsetning til plantens enzym er det bakterielle enzymet også aktivt i nærvær av N-fosfonometyl glycin (glyfosat). De transgene plantene vil derfor tolerere høyere doser av herbicider med virkestoff glyfosat sammenlignet med konkurrerende ugras.

Molekylær karakterisering

Southern analyser viser at de rekombinante gensekvensene som er satt inn i maislinjene MON 863, MON 810 og NK 603 er bevart i den kryssede maishybridene MON 863 x MON 810 x NK 603. Genetisk stabilitet av de innsatte sekvensene har tidligere blitt vist for MON 863, MON 810 og NK 603. Nivåene av uttrykt Cry3Bb1-, Cry1Ab- og CP4 EPSPS – protein målt i korn og vegetativt vev fra mais MON 863 x MON 810 x NK 603 samsvarer med nivåene målt i de respektive foreldrelinjene. Nivået av NPTII-protein var under deteksjonsgrensen for analysene. VKMs faggruppe for GMO anser den molekylære karakteriseringen av mais MON 863 x MON 810 x NK 603 som tilfredsstillende.

Komparative analyser

Komparative analyser av mais MON 863 x MON 810 x NK 603 og konvensjonell kontroll ble utført av søker under feltforsøk i Argentina vekstsesongen 2002-2003. Tretten konvensjonelle maissorter var inkludert i feltforsøkene og brukt som referanser. Med unntak av små variasjoner, insekts-resistens og herbicidtoleransen mediert av Cry3Bb1, Cry1Ab og CP4 EPSPS -proteinene, viste resultatene ingen biologisk relevante forskjeller mellom maishybriden MON 863 x MON 810 x NK 603 og konvensjonell kontroll.

Basert på gjennomgangen av tilgjengelige data konkluderer VKMs faggruppe for GMO at mais MON 863 x MON 810 x NK 603 er vesentlig lik konvensjonell kontroll med hensyn til næringsstoffsammensetning og agronomiske og fenotypiske egenskaper, med unntak av de nye proteinene.

Helserisikovurdering

En fôringsstudie utført på broilere indikerer ikke helseskadelige effekter av mais MON 863 x MON 810 x NK 603, og studien viser at den er ernæringsmessig lik konvensjonell mais. Proteinene Cry3Bb1, Cry1Ab, CP4 EPSPS og NPTII viser ingen relevante sekvenslikheter med andre kjente toksiner eller IgE-avhengige allergener, og er heller ikke rapportert å ha forårsaket IgE-medierte allergiske reaksjoner. Enkelte studier har derimot indikert at Cry-proteiner potensielt kan forsterke andre allergiske reaksjoner (virke som adjuvans).

Ut i fra dagens kunnskap konkluderer VKMs faggruppe for GMO at mais MON 863 x MON 810 x NK 603 er ernæringsmessig lik konvensjonell mais, og at det er lite sannsynlig at proteinene Cry3Bb1, Cry1Ab, CP4 EPSPS og NPTII vil føre til økt risiko for toksiske eller IgE-medierte allergiske reaksjoner fra mat eller fôr basert på mais MON 863 x MON 810 x NK 603 sammenliknet med konvensjonelle maissorter.

Miljørisiko

Antibiotikaresistens

Maishybriden MON 863 x MON 810 x NK 603 inneholder antibiotikasresistensmarkørgenet *nptII*.

Faggruppen konkluderer med at risikoen for nedsatt terapieffekt ved enkelte infeksjoner i husdyrproduksjon forårsaket av spredning av *nptII*-genet fra maishybriden antas å være lav. Dette grunnet begrenset mulighet for positiv seleksjon av bakterier etter sjeldne tilfeller av horisontal genoverføring (HGT) fra plante til bakterie. I tillegg er det variabel forekomst av andre aminoglykosid-resistens determinanter i relevante bakteriepopulasjoner.

Det påpekes videre store forskjeller i geografisk utbredelse av antibiotikaresistens i Europa, og at det mangler publisert dokumentasjon på forekomsten av *nptII*-genet i Norge. Det foreligger ikke vitenskapelig litteratur som indikerer at forekomsten av *nptII*-genet i Norge er utbredt. Det påpekes også at neomycin benyttes i norsk landbruk, og at et seleksjonstrykk på eventuelle sjeldne transformanter (bakterier som har tatt opp og inkorporert *nptII*-genet i eget genom) derfor ikke kan utelukkes.

Øvrig miljørisiko

Søknad EFSA/GMO/UK/2004/07 gjelder godkjenning av maishybrid MON 863 x MON 810 x NK 603 til import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av maisen.

Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av maislinjen i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Risiko for utkryssing med dyrkede sorter vurderes til å være ubetydelig. Ved foreskrevne bruk av maislinjen MON 863 x MON 810 x NK 603 antas det ikke å være risiko for negative effekter på målorganismer, ikke-målorganismer (med mulig unntak av patogene mikrober) eller på abiotisk miljø i Norge.

Samlet vurdering

Ut i fra dagens kunnskap konkluderer VKMs faggruppe for GMO, at maishybriden MON 863 x MON 810 x NK 603 er vesentlig lik konvensjonell kontroll med hensyn til næringsstoffsammensetning og ernæringsmessige, agronomiske og fenotypiske egenskaper, med unntak av de nye proteinene. Det lite sannsynlig at proteinene Cry1Ab, Cry3Bb1, CP4 EPSPS og NPTII vil føre til økt risiko for toksiske eller IgE-medierte allergiske reaksjoner fra mat eller fôr basert på mais MON 863 x MON 810 x NK 603 sammenliknet med konvensjonelle maissorter.

Risikoen for nedsatt terapieffekt ved enkelte infeksjoner knyttet til husdyrproduksjon forårsaket av eventuell spredning av *nptII*-genet fra MON 863 x MON 810 x NK 603 antas av faggruppen å være lav. Det påpekes store forskjeller i geografisk utbredelse av antibiotikaresistens i Europa, og at det mangler publisert dokumentasjon på naturlig forekomst av *nptII*-genet i Norge. En positiv seleksjon av eventuelle sjeldne transformanter (bakterier som har tatt opp og inkorporert *nptII*-genet fra mais MON 863 x MON 810 x NK 603 i eget genom) kan derimot ikke utelukkes ettersom neomycin brukes i norsk landbruk. Forekomsten av slike sjeldne transformante bakterier må også ses i sammenheng med den naturlige forekomsten av *nptII*-genet og andre antibiotikaresistensgener som allerede eksisterer blant bakteriepopulasjoner i relevante norske miljøer.

VKMs faggruppe for genmodifiserte organismer finner det lite trolig at den omsøkte bruken av mais MON 863 x MON 810 x NK 603 vil medføre endret risiko for miljøet for øvrig i forhold til konvensjonell mais.

Nøkkelord: Mais, *Zea mays* L., genmodifisert maishybrid MON 863 x MON 810 x NK 603, EFSA/GMO/UK /2004/07, insektresistens, herbicidtoleranse, glyfosat, Cry3Bb1, Cry1Ab, NPTII, CP4-EPSPS, helse og miljørisiko, forordning 1829/2003/EF, direktiv 2001/18/EF

Forkortelser og ordforklaringer

ADF	Acid detergent fiber, fiberfraksjon av ufordøyelig plantemateriale i fôr, vanligvis cellulosefiber dekket med lignin og silikat. Plantematerialet fordøyes med en syre-detergentløsning, ufordøyd masse betegnes som ADF. Fôr med lavt ADF-innhold er mer fordøyelig og har større energiinnhold.
Allel	Et bestemt gen kan foreligge i ulike varianter (alleler). Allelene kan være dominante (bestemmende for fenotypen) eller recessive (vikende).
ALS	Acetolactatsyntase-enzym
ARMG	Antibiotikaresistensmarkørgen
Backcross (BC)	<p>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 sykdomsresistens, til elitelinjer av både kryssbefruktede og selvpollinerte arter.</p> <p>Gjentatte tilbakekryssinger reduserer det genetiske bidraget, som uønskede alleler fra den andre donorplanten.</p> <p>BC₁, BC₂ etc: betegnelse på 1. og 2. tilbakekryssingsgenerasjon, etc.</p>
BLASTn	Algoritme som benyttes for homologisammenligning av nukleotidsekvenser.
BLASTP	Algoritme som benyttes for homologisammenligning av aminosyresekvenser i proteiner.
BLASTx	Algoritme som benyttes for oversetting fra kodende nukleotidsekvenser til aminosyresekvenser.
bp	Basepar i DNA
<i>B.t.</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Codex	FAO/WHO-organ som etablerer globale handelsstandarder for mat.
CP4	<i>Agrobacterium</i> sp. stamme CP4

CP4 EPSP	Glyfosattolerant versjon av enzymet 5-enolpyruvylsikumat-3-fosfatsyntetase EPSPS, essensielt i syntesen av aromatiske aminosyrer i planter
<i>cp4 epsps</i>	DNA-sekvensen fra <i>Agrobacterium</i> sp. stamme CP4, som koder for CP4 EPSPS-enzymet, som ikke inaktiveres av virkestoffet glyfosat i bredspektrede ugressmidler som f.eks. Roundup.
Cry	Krystall protein fra <i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>cry1Ab</i>	Gen fra jordbakterien <i>Bacillus thuringiensis</i> subspecies <i>kurstaki</i>
Cry1Ab	δ-endotoksin isolert fra jordbakterien <i>Bacillus thuringiensis</i> subspecies <i>kurstaki</i> . Toksinet gjør maisplante resistente mot angrep fra enkelte arter i ordenen <i>Lepidoptera</i> .
<i>cry3Bb1</i>	Gen fra jordbakterien <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kumamotoensis</i> .
Cry3Bb1	δ-endotoksin, som gir plantene resistens mot angrep fra bladbiller i slekten <i>Diabrotica</i> .
DG JRC-EURL	Directorate-General Joint Research Centre - European Union Reference Laboratory
DNA	Deoxyribonukleinsyre (DNA)
Dominant allel	Et allel som uttrykker samme fenotype, uavhengig av om allelene i genparet er like (homozygot) eller ulike (heterozygote).
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FAO	Food and Agriculture Organization, FNs organisasjon for ernæring og landbruk.
FIFRA	US EPA Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act. USAs føderale lov om insektdrepende midler, soppdrepende midler og midler mot skadedyr.
Fitness	Et individs relative evne til å føre sine gener/alleler videre til kommende generasjoner.
GLP	Good Laboratory Practices, retningslinjer for godt laboratoriearbeid.
GMO	Genmodifisert organisme

GMP	Genmodifisert plante
HGT	Horisontal genoverføring
Konstitutivt uttrykk	Cellulær produksjon av et molekyl med konstant hastighet og som ikke reguleres av indre og ytre stimuli.
Konstitutivt gen	Et gen hvis aktivitet bare avhenger av hvordan promoteren til genet binder RNA polymerase.
Locus	Spesifikk posisjon på kromosomet der et gen er lokalisert.
MALDITOF	Massespektrometrimetode for å måle molekylvekt til peptider.
Mannose	Monosakkarid
MDIR	Miljødirektoratet
Mendelsk nedarving	Lovmessig nedarvingsmønster ved ulike typer kryssinger.
MT	Mattilsynet
NOAEL	No observed adverse effect level – dosenivå hvor ingen skadelige effekter observeres.
NOEL	No observed effect level - nulleffektnivå
NDF	Neutral detergent fiber, dvs. fiberfraksjon som inneholder hemicellulose og ADF.
Northern blot	Teknikk for overføring av RNA til en membran for påvisning av uttrykte RNA-sekvenser.
Nær-isogen linje	Linjer eller sorter som er genetisk identiske, med unntak av ett lokus eller kromosomsegment.
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
ORF	Open Reading Frame (åpen leseramme)
OSWP	Overseason whole plant
PCR	Polymerase chain reaction. Polymerase kjedereaksjon. Metode for å syntetisere et stort antall kopier av en DNA-sekvens vha primere.
RNA	Ribonukleinsyre

SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat (SDS)-polyakrylamidelektroforese. Elektroforesemetode for separasjon av proteiner.
Southern blot	Teknikk for overføring av DNA til en membran for videre studier av overførte DNA-sekvenser.
T-DNA	DNA fra Ti-plasmidet som er i jordbakterien <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Ti-plasmidet (Transfer-DNA) overføres fra bakterien, og settes inn i plantecellenes kjernegenom. T-DNAet som overføres avgrenses av V (venstre) og H (høyre) flankeseqvenser, og begrenser derfor den delen av Ti-plasmidet som overføres og gjør at resten av vektoren ikke blir satt inn i plantekromosomene.
USDA	United States Department of Agriculture
U.S. EPA	United States Environmental Protection Agency, USAs Miljøvernmyndighet
Utviklingsstadier hos mais:	
	<u>Vegetative stadier</u>
	VE: oppspiring
	V1: 1. blad
	V2: 2. blad
	V(n): n'te blad
	VT: synlige hannblomsterstand (tassel)
	<u>Reproduktive stadier</u>
	R1: synlige hunnblomster
	R2: 'blister'
	R3: melkematning
	R4: deigmatning
	R5: dent
	R6: fysiologisk moden
Western-blot	Metode for overføring av proteiner til en membran som binder protein.
WHO	World Health Organisation. Verdens helseorganisasjon, organ under FN

Bakgrunn

Den genmodifiserte maishybriden MON 863 x MON 810 x NK 603 (Unik kode MON-ØØ863-5 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6) fra Monsanto Company ble søkt godkjent til import, prosessering, og som mat og fôr under forordning 1829/2003/EF i 2004 (EFSA/GMO/UK/2004/07). Søknaden ble fremmet og anbefalt av belgiske myndigheter i november 2004, og funnet komplett og lagt ut på offentlig høring på EFSA's GMO Extranet 14. januar 2005. EFSA's helse- og miljørisikovurdering av maishybriden ble publisert 6. juli 2005 (EFSA 2005), og søknaden godkjent 2. mars 2010 (Kommisjonsbeslutning 2010/139/EU).

I forbindelse med EFSA's offentlige høring av søknad EFSA/GMO/UK/2004/07 i 2005, vurderte VKM maishybriden med hensyn på mulig helserisiko (VKM 2005a). Endelig miljørisikovurdering av MON 863 x MON 810 x NK 603 ble utført av VKM i 2013 (VKM 2013) Utenfor EU/EØS-området er MON 863 x MON 810 x NK 603 godkjent for alle bruksområder (inkludert dyrking) i Japan og Canada (CERA 2012). I tillegg er maislinjen godkjent for omsetning som mat og/eller fôr i Korea, Mexico, Taiwan og Filippinene.

Oppdrag fra Mattilsynet

Miljødirektoratet har det overordnede ansvaret for behandling av søknader om utsetting av genmodifiserte organismer (GMO). Dette innebærer blant annet å koordinere søknadsbehandlingen, samt å foreta helhetlig vurdering og anbefaling til Miljøverndepartementet i forbindelse med norsk sluttbehandling av søknadene. Direktoratet har ansvar for å vurdere miljørisiko ved utsetting av GMO, samt å vurdere produktets innvirkning på bærekraft, samfunnsnytte og etikk i henhold til genteknologiloven.

Mattilsynet er ansvarlig for å vurdere risiko for menneske- og dyrehelse ved utsetting av GMO i henhold til genteknologiloven og matloven. Mattilsynet forvalter i tillegg regelverk for avlede produkter fremstilt på grunnlag av GMO, samt landbruksfaglige vurderinger i henhold til eget sektorlovverk.

I forbindelse med forberedelse til implementering av forordning 1829/2003 i norsk rett har Miljødirektoratet bedt Mattilsynet om vurderinger av alle genmodifiserte organismer (GMOer) og avledete produkter som inneholder eller består av GMOer som er godkjent under forordning 1829/2003 eller direktiv 2001/18, og som er godkjent for ett eller flere bruksområder som omfattes av genteknologiloven. På den bakgrunnen har Mattilsynet, i brev av 13. februar 2013 (ref. 2012/150202), bedt Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM) om å utarbeide endelige vitenskapelige risikovurderinger av 39 GMOer og avledete produkter som inneholder eller består av genmodifiserte organismer, innen Mattilsynets sektoransvar. VKM er bedt om endelige risikovurderinger for de EU-godkjente søknader hvor VKM ikke har avgitt endelig risikovurdering. I tillegg er VKM bedt om å vurdere hvorvidt det er nødvendig med oppdatering eller annen endring av de endelige risikovurderingene som VKM tidligere har levert.

Oppdraget fra Mattilsynet inkluderer vitenskapelige vurderinger av helserisiko av genmodifiserte organismer til bruk som mat og fôr, samt avledete, prosesserte ikke-spiredyktige næringsmidler og fôrvarer.

VKM er også bedt om å vurdere den landbruksrelaterte miljørisikoen for genmodifiserte planter i de tilfeller søknaden gjelder en art som er relevant for dyrking i Norge. Avhengig av hvilket bruksområde de genmodifiserte plantene søkes godkjent for, gjelder oppdraget miljørisiko knyttet til import, transport, videreforedling/prosessering og dyrking.

Ved søknader om dyrking skal følgende vurderes: (i) Miljørisiko som følge av andre, nye egenskaper i den genmodifiserte planten enn i dagens sortsmateriale og (ii) Miljørisiko som følge av endret dyrkingspraksis ved dyrking av den genmodifiserte planten (bl.a. plantevernmiddelbruk og jordarbeiding) i forhold til dagens vanlige driftsopplegg. Dette gjelder både direkte og sekundære effekter av endret dyrkingspraksis.

Hvis søknaden omfatter dyrking, er VKM videre bedt om å vurdere risiko knyttet til sameksistens. Dette omfatter potensialet for spredning av transgener til arealer og avlinger

fra arealer der det ikke dyrkes genmodifiserte planter, utvikling av ugraspopulasjoner, samt spredning til ville populasjoner av samme art eller nærstående arter utenfor dyrking. Vurderingen skal også inkludere risiko ved bruk av aktuelle virkemidler som har til hensikt å muliggjøre sameksistens. Vurderingen skal omfatte tiltak eller operasjoner som pågår fram til og med høsting. VKM skal bare vurdere sameksistens når søknaden gjelder en art som er relevant for dyrking i Norge.

Vurderinger av søkers overvåkingsplaner er ikke en del av Mattilsynets oppdrag.

Risikovurdering

1 Innledning

Helse og miljørisikovurderingen av den genmodifiserte maishybriden MON 863 x MON 810 x NK 603 er basert på dokumentasjon gjort tilgjengelig på EFSA's GMO Extranet. I tillegg er det benyttet uavhengige vitenskapelige publikasjoner med referee i vurderingen. MON 863 x MON 810 x NK 603 er risikovurdert i henhold til tiltenkt bruk i EU/EØS-området, og i overensstemmelse med miljø- og helsekravene i matloven og genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven. Videre er kravene i forordning 1829/2003/EF og utsettingsdirektiv 2001/18/EF med annekser, lagt til grunn for vurderingen.

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 veiledningsdokumenter for risikovurdering av genmodifiserte planter og avledete næringsmidler og fôrvarer (EFSA 2006, 2010, 2011).

Beskrivelse av egenskaper og virkningsmekanismer

Foreldrelinjen MON 863 er produsert ved biolistisk transformasjon (partikkelakselerasjon) av kallusvev fra den innavlede maislinjen A634. Linjen har vært mye benyttet i produksjon av konvensjonelle hybridsorter i USA. Den innsatte genkonstruksjonen inneholder *cry3Bb1*-genet fra jordbakterien *B. thuringiensis* subsp. *kumamotoensis*. Uttrykket av *cry*-genet kontrolleres av en modifisert utgave av *CaMV 35 S* promotoren (4-AS1) fra blomkålmosaikkvirus. *Cry3Bb1*-genet koder for et δ -endotoksin, som gir plantene toleranse mot angrep fra arter i billeslekten *Diabrotica*. Maislinjen inneholder også antibiotikaresistensmarkørgenet *nptII* fra *E. coli*, under kontroll av promotoren *CaMV 35 S*. *NptII* koder for enzymet neomycin fosfotransferase II, og gir resistens mot aminoglykosidantibiotika som kanamycin og neomycin. Genet er introdusert som seleksjonsmarkør for identifikasjon av transformanter under regenerasjonen.

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

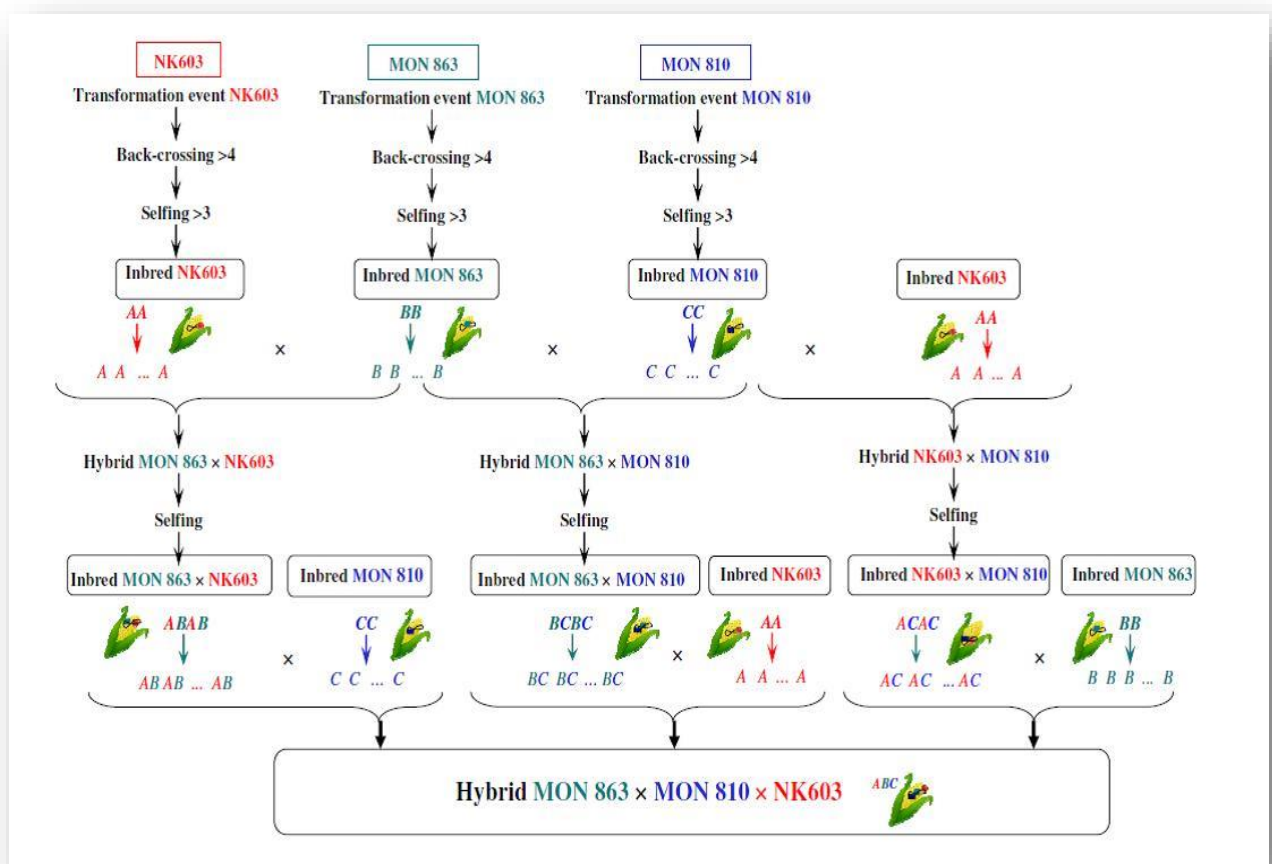
Foreldrelinje NK 603 uttrykker CP4-EPSPS-proteinet, som er resultat av introduksjon av *cp4-epsps*-genet fra jordbakterien *Agrobacterium tumefaciens*. Genet koder for enzymet 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfat syntetase, som omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfat, en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. I motsetning til plantens enzym er det bakterielle enzymet også aktivt i nærvær av N-

fosfonometylglycin (glyfosat). De transgene plantene vil derfor tolerere høyere doser av herbicider med virkestoff glyfosat sammenlignet med konkurrerende ugras.

2 Molekylær karakterisering

2.1 Hybridproduksjon

Hybridforedling er den dominerende foredlingsstrategien i konvensjonell foredling og sortsutvikling i mais i dag. Metodikken innebærer utvikling av innavlede, tilnærmet homozygote foreldrelinjer, som så krysses for produksjon av F1-hybridfrø. Dette gir ensartede og produktive sorter (heterosiseffekt). Den transgene hybriden MON 863 x MON 810 x NK 603 er dannet ved konvensjonelle kryssinger mellom maislinjene MON 863, MON 810 og NK 603, se figur 1.



Figur 1. Kryssingsskjema for maishybriden MON 863 x MON 810 x NK 603.

2.2 Evaluering av foreldrelinjer

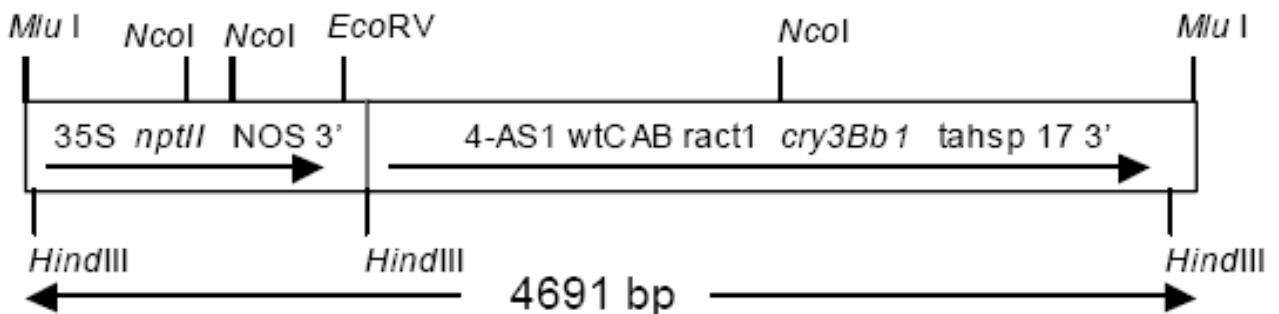
2.2.1 Foreldrelinje MON 863

Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

MON 863 inneholder et rekombinant DNA-fragment på 4691 basepar fra PV-ZMIR13-plasmidet. DNA-fragmentet inkluderer to ekspresjonskassetter. Ekspresjonskassetene inneholder henholdsvis ett *cry3Bb1*-gen med regulatoriske områder og ett *nptII*-gen med regulatoriske områder (figur 2, tabell 1).

Cry3Bb1- og *nptII*-ekspresjonskassetene inneholder følgende DNA-elementer:

- CaMV *e35s* promotor,
- *nptII* åpen leseramme som koder for proteinet NPTII,
- trunkt *ble* (150 basepar) og *NOS* 3'-termineringsekvens for transkripsjon,
- *4ASI* 4 tandemkopier av ASI (modifisert *35s* promotor),
- *wtCAB* 5'-mRNA-ledersekvens fra hvete, klorofyll a/b protein,
- *rac1* intron fra ris, aktin 1 gen,
- *cry3Bb1 ORF*, som koder for Cry3Bb1-protein,et,
- *tahsp17* 3'-polyadeninsekvens fra hvete *hsp17.3* gen som avslutter ekspresjonen.



Figur 2. Illustrasjon av det rekombinante DNA-fragment i genomet til maislinjen MON 863.

Karakterisering av geninnsettingen og det rekombinante DNA-fragmentet

Det er foretatt en rekke undersøkelser av antall kopier av ekspresjonskassetene og antall insersjonssteder i genomet. Videre er det foretatt sekvensering av DNA oppstrøms og nedstrøms for innsettingsstedet (5'- og 3'-flankesekvenser). I tillegg er integriteten til ekspresjonskassene i genomet, fravær av andre åpne leserammer enn de som er satt inn, og fravær av annet transformasjonsplasmid DNA i MON 863 vurdert.

Det konkluderes med at det kun er én kopi av ekspresjonskassetten i MON 863. Sammenlignende DNA-analyser mellom MON 863 og ikke-transgen hybridlinje MON 864 (A1 x A634) viser at bruttostørrelsen på det innsatte DNA-fragmentet er intakt. Det kan derfor ikke forventes endringer i ekspresjonen fra dette elementet.

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

I henhold til dokumentasjon fra søker er nivået av uttrykk av Cry3Bb1-protein målt i prøver av hel plante, blad, røtter, og frø fra fire feltforsøk i USA vekstsesongen 1999. I tillegg ble konsentrasjon av Cry3Bb1 målt i hunnblomster (arrene) fra forsøk i USA og Argentina, mens toksinnivået i pollen ble målt i plantemateriale fra tre lokaliteter i Argentina. Nivået av Cry3Bb1-protein varierte mellom 10 og 81 µg/g ferskvekt, avhengig av utviklingsstadium og vevstype. Konsentrasjonen av proteinet i blad, hel plante og rotvev ble redusert utover i vekstsesongen, og var i gjennomsnitt 81 µg/g i unge blad, 70 µg/g i frø, 41 µg/g i røtter, 39 µg/g i hel plante og 62 µg/g i pollen.

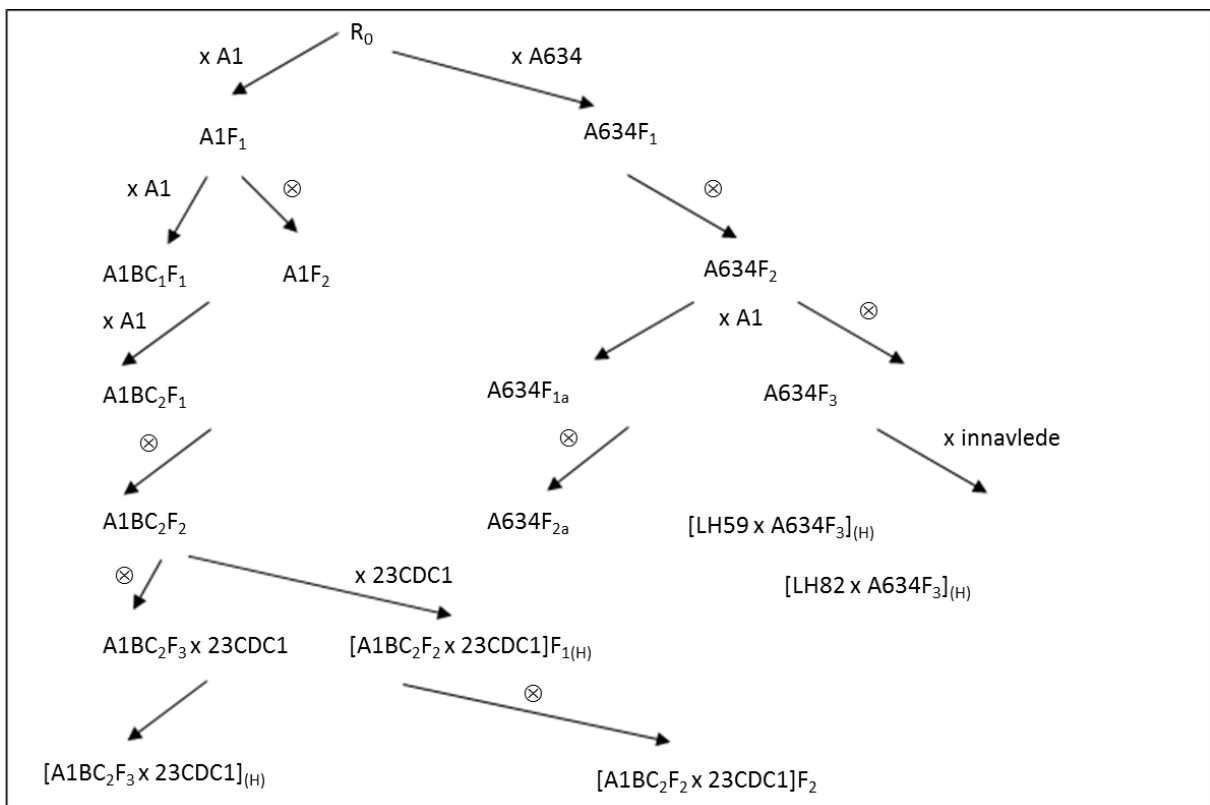
Uttrykk av NPTII ble målt i unge blad, hel plante og frø av MON 863, og varierte fra ikke detekterbar (< 0,076 µg/g) til 1,4 µg/g ferskvekt.

Tabell 1. Genelementer fra plasmid PV-ZMIR13, som er satt inn i genomet til MON 863

Genetic Element	Size (kb)	Function
<i>cry3Bb1</i> gene cassette:		
4-AS1	0.22	Promoter for the <i>cry3Bb1</i> gene in MON863 corn. The promoter consists of four tandem repeats of activating sequence-1 (AS1)(Lam and Chua 1990) and a single portion of the 35S promoter (Odell et al 1985) both derived from cauliflower mosaic virus (CaMV). AS1 is a 21 base pair element associated with the 35S promoter, which has been linked with high levels of protein expression in roots (Lam et al 1989).
wt CAB	0.06	The 5' non-translated leader sequence of the wheat chlorophyll a/b binding protein. This leader sequence facilitates mRNA translation (Lamppa et al 1985).
act 1 intron	0.49	The first intron from the rice actin 1 gene, which enhances DNA transcription (McElroy et al 1990).
<i>cry3Bb1</i>	1.96	The coding sequence for the Cry3Bb1 variant protein produced in <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kumamotoensis</i> .
thsp 17 3'	0.23	The 3' nontranslated region of the coding sequence for wheat heat shock protein 17.3, which ends transcription and directs polyadenylation (McElwain and Spiker 1989).
Selectable marker:		
35S	0.35	The 35S promoter from CaMV (Odell et al 1985).
<i>nptII</i>	0.97	Coding sequence for gene encoding the enzyme neomycin phosphotransferase II from <i>Escherichia coli</i> transposon Tn5 (Beck et al 1982). The DNA derived from <i>E. coli</i> also includes a 153 base pair segment of the bleomycin binding protein gene (<i>ble</i>). The fragment of <i>ble</i> is located 20 base pairs downstream of the <i>nptII</i> stop codon.
NOS 3'	0.26	The 3' nontranslated region of the nopaline synthase gene of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA, which ends transcription and directs mRNA polyadenylation (Bevan et al 1983).

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

Monsanto viser til en rekke undersøkelser som dokumenterer at det rekombinante DNA-innskuddet er stabilt integrert i genomet, og stabilt nedarvet over generasjoner. Analyser av Southern blot viser stabilitet av det rekombinante innskuddet over 3 selvpollineringsgenerasjoner og 9 generasjoner fra kryssinger av $R_0 \times A1$ and $R_0 \times A634$ (figur 3). Videre er fenotypisk stabilitet demonstrert ved spaltingsdata fra tre kryssingsgenerasjoner og to generasjoner med selvbestøvning etter $R_0 \times A1$. Segregeringsanalysene (Chi-kvadrat-analyser) viser forventet mendelsk nedarving av *cry3Bb1*-genet.



R_0 - Opprinnelig modifisert plante

\otimes - Selvpollinert

H - Hybrid

Figur 3. Kryssingsskjema for genmodifisert maislinje MON 863.

Delkonklusjon

Faggruppen har tidligere vurdert karakteriseringen av det rekombinante innskuddet, de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av MON 863 til å være tilfredsstillende (VKM 2006, 2008).

2.2.2 Foreldrelinje MON 810

Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

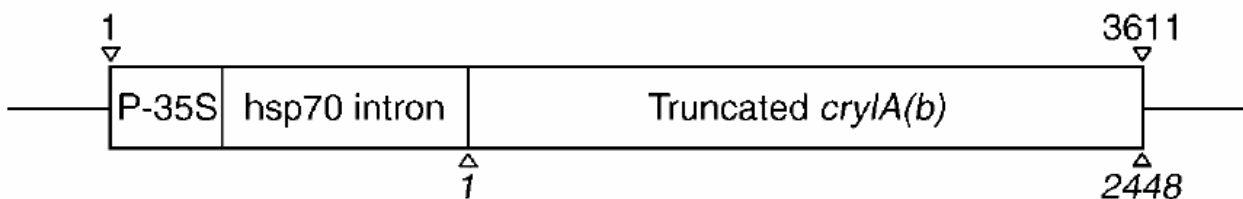
Cry1Ab-ekspressjonskassetten inneholder *e35s*-promoter fra blomkålmosaikkvirus (CaMV), intronet *hsp70* fra mais og et trunkert *cry1Ab*-gen, og finnes som én kopi i genomet. *Cry1Ab*-genet stammer fra jordbakterien *Bacillus thuringiensis*. DNA-fragmentet, som stammer fra plasmidet PV-ZMBK07, ble overført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

Karakterisering av geninnsettingen/genkonstruksjonen

Southern blot og PCR har blitt brukt for å karakterisere det rekombinante DNA-fragmentet i planten. Molekylærbiologisk karakterisering viser at det bare er satt inn én kopi av det rekombinante DNA-fragmentet i maisens genom. Dette fragmentet inneholder følgende gener og DNA elementer (Figur 4):

***Cry1Ab* - ekspressjonskasset:**

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



Figur 4. Rekombinant DNA- fragment i maisens genom.

Karakterisering av geninnsettingen

Monsanto har i forbindelse med nyere søknader av hybrider med MON 810, eksempelvis EFSA-RX-MON 863 x MON 810, lagt ved oppdatert dokumentasjon av molekylærbiologiske analyser for MON 810. Disse molekylærbiologiske analysene viser at det rekombinante fragmentet i planten inneholder et trunkert *cry1Ab* gen, en trunkert *e35S* promoter og et fullengde *hsp70*-intron (figur 3). Cry1Ab- proteinet som uttrykkes i maiskorn er undersøkt med Western-blot analyse, SDS-PAGE, densitometri, trypsinbehandling av proteinet og Southern blot.

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

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

Monsanto viser til at konsentrasjonen av Cry1Ab1-protein er målt i prøver av MON 810 dyrket i feltforsøk i USA og Europa i perioden 1994-1996. De nordamerikanske forsøkene var lokalisert på henholdsvis 6 og 5 steder vekstsesongene 1994 og 1994. I tillegg ble maislinjen testet i felt på henholdsvis 4 og 3 lokaliteter i Frankrike og Italia i 1995 og 1996. Det ble tatt prøver av blad, hel plante og frø. Proteinekspressjonen i frø ble målt til henholdsvis $0,31 \pm 0,09$ µg/g ferskvekt (variasjonsbredde = 0,19 – 0,39), $0,57 \pm 0,21$ µg/g ferskvekt (variasjonsbredde = 0,39 – 0,91), $0,53 \pm 0,12$ µg/g ferskvekt (variasjonsbredde = 0,42 – 0,69) og $0,41 \pm 0,06$ µg/g ferskvekt (variasjonsbredde = 0,35 – 0,46). I prøver av hel plante ble det målt konsentrasjoner av Cry1Ab på henholdsvis $4,15 \pm 0,71$ µg/g ferskvekt (variasjonsbredde = 3,65 – 4,65), $3,34 \pm 1,09$ µg/g ferskvekt (variasjonsbredde = 2,31 – 4,48), $4,80 \pm 0,75$ µg/g rå (variasjonsbredde = 4,11 – 5,56) og $4,88 \pm 0,52$ µg/g ferskvekt (variasjonsbredde = 4,32 – 5,34).

Teoretiske analyser av mulige polypeptider fra hver leseramme v.h.a. allergen (AD4 (5')/UPDATE2 (3'))-, toksin (TOXIN5(5') og Toxin4 (3'))- og peptid (ALLPEPTIDES (5' og 3'))- databaser er utført. Sekvenser som flankerer 5' viser, i henhold til Monsanto, ingen strukturelle likheter til allergener, toksiner og farmakologiske aktive proteiner. Imidlertid viser sekvenseringsanalyser utført av Holck et al. (2002) stor likhet til genklusteret *α -zein* som sitter i maiskromosom 4. Det er ikke funnet andre sekvenser som har likheter med kjente maisgener. Resultatene fra disse teoretiske analysene viser at det er lite sannsynlig at det dersom noen av disse leserammene skulle bli transkribert vil resultere i polypeptider som medfører potensielle toksiske eller allergene konsekvenser. Sekvenser som flankerer 3' viser i henhold til Monsanto ingen strukturelle likheter til allergener, toksiner og farmakologiske aktive proteiner. Det er imidlertid funnet sekvenslikhet til proteinet importin α . Monsanto hevder at om et kimært peptid dannes vil ikke dette være skadelig for mennesker eller dyr, ettersom 90 dagers fôringsstudie på rotter viser ingen forskjell mellom MON 810 og umodifisert mais.

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

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

Delkonklusjon

Faggruppen har tidligere vurdert de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av proteinene og funnet at informasjonen er tilstrekkelig (VKM 2007 a,b). Faggruppen konkluderer med at karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i MON 810 er tilfredsstillende.

2.2.3 Foreldrelinje NK 603

Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

Cp4-epsps-genet fra *Agrobacterium*-stamme CP4 ble klonet inn i plasmidet PV-ZMGT32. Det rekombinante DNA-fragmentet på 6706 basepar fra PV-ZMGT32-plasmidet inneholder to ekspresjonskassetter med et enkelt *cp4-epsps*-gen i hver kassett. Den første kassetten inneholder en aktinpromotor og et intron (r-act P+I) fra ris, et optimalisert kloroplastoverføringspeptid (CTP2), og en nopalinsyntase 3'-ende terminatorsekvens (NOS3'). Den andre ekspresjonskassetten inneholder en *e35S*-promotor, et ZmHSP70 intron *cp4-epsps* gen og en nopalinsyntase 3'-ende terminatorsekvens (NOS3'). DNA-fragmentet ble overført til embryogene maisceller ved hjelp av partikkelaksellerasjonsmetoden. DNA-fragmentet inneholder ikke antibiotikaresistensgen. Transformanter ble selektert ved at de overlevde og vokste i nærvær av glyfosat.

Beskrivelse av de innsatte genene

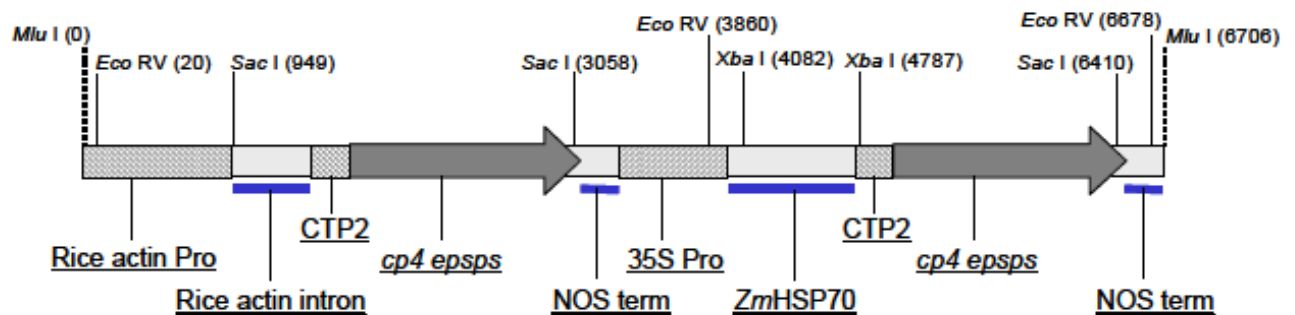
Det er benyttet Southern blot og sekvensering for å karakterisere det rekombinante DNA-fragmentet i planten. Den molekylærbiologiske karakteriseringen viser at det er satt inn et rekombinant DNA-fragment i NK 603 fôrmais. Innsatte gener og regulatoriske elementer i fragmenter er vist i tabell 2, og figur 5.

Tabell 2. Beskrivelse av innsatte gener og regulatoriske elementer i NK 603.

CP4-epsps ekspresjonskasset 1	
<i>P-RactI/I-RactI</i>	Promoter og intron fra ris (<i>Oryza sativa</i>) aktin 1 gen (1,4 kb). Uttrykkes ikke i planten.
<i>TS-CTP2</i>	N-terminal kloroplasttransittpeptid (TS-CTP) fra <i>EPSPS</i> -genet fra vårskrinneblom (<i>Arabidopsis thaliana</i>)-genet. Overfører CP4-EPSPS protein til kloroplast.
<i>CS-Cp4-epsps</i>	Gen som koder for et syntetisk CP4-EPSPS protein. Genet <i>5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase</i> stammer fra jordbakterien <i>Agrobacterium tumefaciens</i> stamme CP4 (1,4 kb).
<i>T-nos 3'</i>	DNA- sekvens fra <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Avslutter transkripsjonen. Uttrykkes ikke i planten.
CP4-epsps ekspresjonskasset 2	
<i>P-e35S</i>	Promoter fra blomkålmosaikkvirus (<i>Cauliflower mosaic virus</i>) (0,6 kb). Uttrykkes ikke i planten.
<i>I-Hsp70</i>	Promoter fra heatshockprotein 70 (0,8 kb). Stammer fra mais.
<i>TS-CTP2</i>	N-terminal kloroplasttransittpeptid (TS-CTP) fra <i>EPSPS</i> -genet fra vårskrinneblom (<i>Arabidopsis thaliana</i>)-genet. Overfører CP4-EPSPS protein til kloroplast.
<i>CS-Cp4-epsps l214p</i>	Gen som koder for et syntetisk CP4-EPSPS protein. Genet <i>5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase</i> stammer fra jordbakterien <i>Agrobacterium tumefaciens</i> stamme CP4 (1,4 kb).
<i>T-nos 3'</i>	DNA-sekvens fra <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Avslutter transkripsjonen. Uttrykkes ikke i planten.

Karakterisering av geninnsettingen

Molekylærbiologiske analyser av NK 603 viser at det rekombinante DNA-fragmentet i planten inneholder de samme gener og genelementer som er på det tilsvarende fragmentet i bakterien. EPSPS-proteinet som uttrykkes i NK 603 er, med unntak av en aminosyre, identisk med proteinet som uttrykkes i bakterien.



Figur 5. Rekombinant lineært DNA-fragment i genomet til maislinjen NK 603. Det rekombinante DNA-fragmentet er på 6706 basepar og stammer fra plasmidet PV-ZMGT32.

Ved revers transkriptase PCR (RT PCR) ble det påvist et transkripsjonsprodukt som startet inne i det rekombinante fragmentet. Transkripsjonen gikk gjennom NOS-terminatoren og inn i maisgenomets flankerende 3' område. To eller flere mRNA-molekyler ble dannet, ett på 1,4 kb (antatt å være *cp4-epsps L214P* transkriptet) og ett større enn 1,4 kb (antatt gjennomlesning av NOS). RT PCR viste at kun en svært liten del av det store fragmentet inneholdt *cp4-epsps* sekvensen. I motsetning til transkriptet på 1,4 kb, kunne ikke dette transkriptet påvises med Northern blot.

Flankerende sekvenser til det rekombinante DNA-fragmentet i planten er analysert, 300 bp oppstrøms og 500 bp nedstrøms. Sammenlignende analyse med foreldrelinjen LH82xB73 viste at de flankerende sekvensene til NK 603s DNA-fragment stammer fra foreldrelinjen.

Strukturell og funksjonell likhet mellom CP4 EPSPS og CP4 EPSPS I214p er undersøkt med røntgenkrystallanalyse, variabel løkkestruktur i proteinet som inneholder det nye prolinet, og domenet som inneholder det nye prolinet. Disse analysene viser at CP4 EPSPS I214p-proteinene er strukturelt lik CP4 EPSPS-proteinene. Analyse av enzymatisk aktivitet viser ingen forskjell mellom de to proteinene. Fordøyelighetstest viste også at begge proteinene fordøyes like raskt i simulert mage og tarmsaft. Mengden CP4-EPSPS i korn er anslått til 0,01 % av den totale proteinmengden.

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

Krysning over seks generasjoner og tre selvpollineringsgenerasjon viser at det rekombinante CP4 EPSPS-fragmentet er stabilt inkorporert i maisgenomet.

Delkonklusjon

Faggruppen har tidligere vurdert de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av CP4 EPSPS-proteinet og funnet at informasjonen er tilstrekkelig (VKM 2005b). Faggruppen konkluderer med at karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i NK 603 er tilfredsstillende.

2.2.4 Hybriden MON 863 x MON 810 x NK 603

Molekylær karakterisering

MON 863 x MON 810 x NK 603 er dannet ved konvensjonelle kryssinger av MON 863, MON 810 og NK 603. Det er foretatt Southern blot-analyse for å undersøke tilstedeværelsen og antall kopier av MON 863-, MON 810- og NK 603-ekspresjonskassetene i MON 863 x MON 810 x NK 603. Det er påvist en enkel kopi av henholdsvis MON 863-, MON 810- og NK 603-ekspresjonskassetene.

Monsanto hevder at andre molekylærbiologiske analyser ikke er nødvendig fordi det er liten sannsynlighet for molekylær gjensidig påvirkning mellom innskuddene fra MON 863, MON 810 og NK 603 i MON 863 x MON 810 x NK 603 fordi de tre ekspresjonskassetene ligger på hvert sitt kromosom. Det konkluderes med at det kun er én kopi av hver av ekspresjonskassetene fra henholdsvis NK 603, MON 810 og MON 863 til stede i hybridene. Sammenlignende Southern blot-analyser mellom hybridene MON 863 x MON 810 x NK 603 og de tre foreldrelinjene viser at bruttostørrelsen på de innsatte DNA-fragmentene er intakte. Det kan derfor ikke forventes endringer i ekspresjonen fra disse elementene.

Informasjon vedr. uttrykk av introduserte gener og åpne leserammer

I likhet med hybridene MON 863xNK 603 beskrevet over, ble plantemateriale fra de samme feltstudiene i Argentina, sesongen 2002 – 2003 brukt til målinger av proteinuttrykk i trippelhybriden MON 863 x MON 810 x NK 603 og kontroller. Plantematerialet ble analysert ved bruk av ELISA for nivåer av uttrykte proteiner for hver av de innsatte genene: *cry3Bb1*, *cry1Ab*, *cp4-epsps* og *nptII*. Verdiene som er oppgitt i søknaden for hybridmaisen (Technical dossier November 2004) er kun oppgitt for fôr og korn. Verdiene er oppgitt for både tørrvekt (tabell 3) og ferskvekt (tabell 4), og viser at uttrykket av de innsatte genene i hybridmaisen er i tråd med nivåene uttrykt for de respektive proteinene i foreldrelinjene.

Tabell 3. Proteininnhold i µg/g tørrvekt for de innsatte genene i korn og fôr av hybridmais MON 863 x MON 810 x NK 603, og de tilsvarende foreldrelinjene. Verdiene oppgitt for CP4 EPSPS representerer summen av CP4 EPSPS og CP4 EPSPS L214P, ettersom ELISA ikke skiller mellom disse.

Maislinje		Cry3Bb1 µg/g t.v. ± S.D.	Cry1Ab µg/g t.v. ± S.D.	CP4 EPSPS µg/g t.v. ± S.D.	NPTII µg/g t.v. ± S.D.
MON863xMON810xNK603	Maiskorn	37 (SD 11)	0,65 (SD 0,08)	11 (SD 2,8)	Under deteksjonsgrensen (0,21 µg/g ferskvekt)
	Fôr	45 (SD 26)	12 (SD 1,9)	95 (SD 27)	
MON863	Maiskorn	29 (SD 3,9)			Under deteksjonsgrensen (0,21 µg/g ferskvekt)
	Fôr	39 (SD 15)			
MON810	Maiskorn		0,77 (SD 0,09)		
	Fôr		12 (SD 3,5)		
NK603	Maiskorn			12 (SD 1,8)	
	Fôr			98 (SD 23)	

t.v. = tørrvekt

Tabell 4. Proteininnhold i µg/g ferskvekt for de innsatte genene i korn og fôr av hybridmais MON 863 x MON 810 x NK 603, og de tilsvarende foreldrelinjene.

Maislinje		Cry3Bb1 µg/g f.v. ± S.D. variasjonsområde	Cry1Ab µg/g f.v. ± S.D. variasjonsområde	CP4 EPSPS µg/g f.v. ± S.D. variasjonsområde	NPTII µg/g f.v. ± S.D. variasjonsområde
MON863xMON810xNK603 (n = 12)	Maiskorn	32 (SD 8,8) 22 - 48	0,56 (SD 0,07) 0,48 - 0,67	9,6 (SD 2,3) 7,0 - 14	Under Deteksjonsgrensen (0,21 µg/g ferskvekt)
	Fôr	13 (SD 7,6) 0,71 - 28	3,5 (SD 0,56) 2,7 - 4,6	27 (SD 8,3) 12 - 41	
MON863 (n = 12)	Maiskorn	25 (SD 3,5) 21 - 32			Under deteksjonsgrensen (0,21 µg/g ferskvekt)
	Fôr	11 (SD 4,8) 5,4 - 19			
MON810 (n = 12)	Maiskorn		0,66 (SD 0,08) 0,51 - 0,75		
	Fôr		3,4 (SD 1,1) 2,5 - 6,4		
NK603 (n = 12)	Maiskorn			10 (SD 1,5) 7,7 - 13	
	Fôr			28 (SD 5,5) 16 - 35	

f.v. = ferskvekt

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

Molekylærbiologiske analyser av F₁-hybriden viser at det er molekylær ekvivalens og identisk kopitall med de rekombinante DNA-innskuddene i de respektive foreldrelinjene. Søker konkluderer derfor med at er det svært sannsynlig de rekombinante innskuddene i hybrid er stabilt integrert i genomet. Søkeren viser også til at dyrkningserfaring med selve hybridmais, med tanke på skadedyr og glyfosat-toleranse, tilsier at de innsatte egenskapene er stabilt nedarvet. Videre vises det til at F₂-generasjonen som høstes ikke skal inngå i videre foredlingsarbeid. Søker vurderer det derfor ikke nødvendig å undersøke stabilitet over generasjoner.

2.3 Konklusjon

Southern analyser viser at de rekombinante gensekvensene som er satt inn i maislinjene MON 863, MON 810 og NK 603 er bevart i den kryssede maishybriden MON 863 x MON 810 x NK 603. Genetisk stabilitet av de innsatte sekvensene har tidligere blitt vist for MON 863, MON 810 og NK 603. Nivåene av uttrykt Cry3Bb1-, Cry1Ab- og CP4 EPSPS – protein målt i korn og vegetativt vev fra mais MON 863 x MON 810 x NK 603 samsvarer med nivåene målt i de respektive foreldrelinjene. Nivået av NPTII-protein var under deteksjonsgrensen for analysene. VKMs faggruppe for GMO anser den molekylære karakteriseringen av mais MON 863 x MON 810 x NK 603 som tilfredsstillende.

3 Komparative analyser

3.1 Valg av komparator og forsøksdesign

Analyser av sammensetning i maiskorn fra maislinjene NK 603, MON 863, MON 810 og MON 863 x MON 810 x NK 603.

Analyse av ernæringsmessige viktige komponenter ble foretatt av NK 603, MON 863, MON 810 og MON 863 x MON 810 x NK 603 fra fire forsøksfelt i Argentina (Ridley *et al* 2004). Som kontroll er det benyttet en kontrollhybrid (DKC-46-26) og tretten kommersielt tilgjengelige referansesorter. NK 603 ble ekskludert fra et felt og kontrollhybrid DKC46-26 fra tre felt. Åtte analyseprøver, henholdsvis to fra DKC46-26, en fra 37P73 og fem fra Dorado ble analysert, men ekskludert fra statistisk analyse på grunn av urenheter eller utilstrekkelig mengde prøvemateriale. MON 863 x MON 810 x NK 603, MON 863, MON 810, NK 603, kontrollhybrid og kommersiell mais ble plantet i randomiserte blokk mønstre. Alle blokker med herbicidtolerante planter ble sprøytet med Roundup UltraMAX. For vurdering av MON 863, MON 810 og NK 603 henviser Monsanto også til forsøk utført i USA og Europa. Dokumentasjonen av slike analyser finnes i de respektive søknadene, og er vurdert av VKM's faggruppe for GMO tidligere (VKM 2005b, 2007b, 2008).

3.1.1 Analyser av ernæringsmessige komponenter

For MON 863, MON 810, NK 603 og MON 863 x MON 810 x NK 603 er valget av analyseparametere gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for mais, med unntak av enkelte komponenter som vist nedenfor. Det er foretatt forskjellige analyser av hovedkomponenter for fôr og korn. For fôr ble det analysert aske, fett, protein, vann, ADF (acid detergent fibre), NDF (neutral detergent fibre), kalsium og fosfat. For korn ble det analysert protein, fett, aske, karbohydrater, ADF, NDF, total fiber, kalorier, vann, aminosyrer, fettsyrer, jern, kalium, kalsium, magnesium, mangan, sink, vitaminene B1, B2, B6, E-vitamin, niacin, folinsyre, de sekundære metabolittene furfural, ferulsyre og p-kumarinsyre, og anti-næringsstoffene fytinsyre og raffinose. Analysene ble utført under god laboratoriepraksis (GLP). Monsanto har for MON 863 og NK 603 ikke foretatt sammenlignende statistiske analyser med MON 863 x MON 810 x NK 603.

For hovedkomponentene protein, fett, aske, karbohydrater, ADF, NDF, total fiber, kalorier, og vann er det funnet statistiske forskjeller for vann og karbohydrater i alle argentinske feltforsøk. Analyser viser at verdier for disse to hovedkomponentene ligger innenfor typiske verdiområder for andre maissorter som er publisert.

Fettsyrer

Fettsyresammensetningen i MON 863, MON 810, NK 603 og MON 863 x MON 810 x NK 603 er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Det ble analysert for 22 fettsyrer. Av disse ble 13 ekskludert fra statistisk analyse fordi mengdene var lavere enn deteksjonsgrensene. De argentinske målingene utført på MON 863 x MON 810 x NK 603 viser statistiske forskjeller over alle forsøksfeltene for de seks fettsyrene 18:0 stearinsyre, 18:1 oljesyre, 18:2 linolsyre, 18:3 linolensyre, 20:0 arakidonsyre, og 22:0 behensyre (tabell 5). Forskjellene er små, mindre enn 10 %, og verdiene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen.

Aminosyrer

Både essensielle og ikke-essensielle aminosyrer ble analysert. De argentinske målingene utført på MON 863 x MON 810 x NK 603 viser statistiske forskjeller for alle forsøksfeltene for aminosyren metionin (tabell 5). Verdien ligger innenfor 6 %, og for alle aminosyrene ligger verdiene innenfor de typiske verdiene som er rapportert i litteraturen.

Vitaminer

Vitaminer som det i henhold til OECDs konsensusdokument for mais bør undersøkes for, er A, B1, B2, B6, C, E, folat og niacin. Vitamin A og vitamin C ble ikke målt i feltforsøkene fra Argentina. Resultatene for folat og niacin viser for MON 863 x MON 810 x NK 603 til dels store statistiske forskjeller innenfor enkelte forsøksfelt, men disse forskjellene er ikke konsistente for alle forsøksfeltene. Det er funnet statistisk forskjell for niacin når alle forsøksfeltene er tatt med i de statistiske analysene, men gjennomsnittsverdien ligger innenfor 99% toleranseintervallet for de kommersielle maislinjene (tabell 5).

Mineraler

Med unntak for selen er mineralene som er målt, i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. I alle de argentinske feltforsøkene er det viste statistisk forskjell for magnesium mellom kontroll (DKC46-26) og MON 863 x MON 810 x NK 603 (tabell 5). Forskjellen ligger imidlertid innenfor 5 % og innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen. Det er ikke funnet statistiske forskjeller for andre mineraler mellom kontroll, referanse-maissorter og MON 863 x MON 810 x NK 603.

Sekundære metabolitter og antiernæringsstoffer

Det er ikke funnet statistiske forskjeller for sekundære metabolitter og antiernæringsstoffer i de argentinske feltforsøkene. Det er ikke målt for plantetoksinene 2,4dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) eller nedbrytningsproduktet 6-methoxy-2-(3H)-benzoxazolinone (MBOA).

Tabell 5. Statistisk signifikante forskjeller over alle forsøksfelt

Tissue/ Component (Units) ^a	Site	Mean Test ^b	Mean Control ^b	Mean Diff. (% of Control Value) ^b	Signif. (p-value) ^b	Test (Range) ^b	99% Tolerance Interval ^{b,c}
Grain							
Ferulic Acid (µg/g DW)	CB-2	2251.75	2524.20	-10.79	0.042	(2124.29 - 2452.19)	[947.52,3316.22]
p-Coumaric Acid (µg/g DW)	CB-2	189.99	214.97	-11.62	0.024	(173.18 - 210.35)	[13.50,374.22]
Carbohydrates (% DW)	All Sites	85.46	85.98	-0.60	0.009	(84.30 - 86.15)	[80.23,89.08]
Total Fat (% DW)	All Sites	3.58	3.39	5.64	0.024	(3.21 - 3.99)	[1.77,5.17]
Methionine (% Total AA)	All Sites	2.07	2.20	-5.72	0.007	(1.81 - 2.35)	[1.52,2.71]
18:0 Stearic (% Total FA)	All Sites	1.60	1.68	-4.74	0.034	(1.53 - 1.68)	[1.37,2.53]
18:1 Oleic (% Total FA)	All Sites	31.73	29.48	7.63	<0.001	(30.58 - 32.48)	[15.95,40.11]
18:2 Linoleic (% Total FA)	All Sites	50.63	53.06	-4.57	<0.001	(49.17 - 52.07)	[42.62,72.43]
18:3 Linolenic (% Total FA)	All Sites	1.05	1.16	-9.26	<0.001	(0.97 - 1.12)	[0.58,1.73]
20:0 Arachidic (% Total FA)	All Sites	0.44	0.42	3.79	0.005	(0.42 - 0.49)	[0.31,0.59]
22:0 Behenic (% Total FA)	All Sites	0.17	0.18	-5.36	0.003	(0.16 - 0.19)	[0.095,0.27]
Magnesium (% DW)	All Sites	0.13	0.12	4.23	0.036	(0.11 - 0.14)	[0.084,0.18]
Niacin (mg/kg DW)	All Sites	18.13	20.81	-12.90	<0.001	(15.81 - 19.89)	[13.51,34.47]
Ferulic Acid (µg/g DW)	All Sites	2007.21	2187.56	-8.24	0.004	(1457.63 - 2452.19)	[947.52,3316.22]

^adw=dry weight; fw=fresh weight; AA=amino acids; FA=fatty acids

^bData obtained from Ridley *et al.* 2004, Appendix 2, Table 11.

^cWith 95% confidence, interval contains 99% of the values expressed in the population of commercial lines. Negative limits were set to zero.

3.2 Agronomiske karakterer

I henhold til søkers dokumentasjon er det foretatt registreringer av fenotypiske og agronomiske parametere ved maishybrid MON 863 x MON 810 x NK 603, nær-isogen kontroll (konvensjonell kontroll) og 13 kommersielle referansesorter i feltforsøk ved fire lokaliteter i Argentina vekstsesongen 2002-2003. Feltforsøkene viser små eller ingen signifikante forskjeller mellom den transgene maishybriden og umodifisert konvensjonell kontroll med hensyn til karakterer som frøplantevitalitet, tidlighet (antall dager til blomstring og pollenspredning), plantehøyde, rotlengde, stikklengde, kolbehøyde, plantetetthet, plantebestandens beskaffenhet ("stay green"), og frøavling.

3.3 Konklusjon

Komparative analyser av mais MON 863 x MON 810 x NK 603 og konvensjonell kontroll ble utført av søker under feltforsøk i Argentina vekstsesongen 2002-2003. Tretten konvensjonelle maissorter var inkludert i feltforsøkene og brukt som referanser. Med unntak av små variasjoner, insekts-resistens og herbicidtoleransen mediert av Cry3Bb1, Cry1Ab og CP4 EPSPS -proteinene, viste resultatene ingen biologisk relevante forskjeller mellom maishybriden MON 863 x MON 810 x NK 603 og konvensjonell kontroll.

Basert på gjennomgangen av tilgjengelige data konkluderer VKMs faggruppe for GMO at mais MON 863 x MON 810 x NK 603 er vesentlig lik konvensjonell kontroll med hensyn til næringsstoffsammensetning og agronomiske og fenotypiske egenskaper, med unntak av de nye proteinene.

4 Helserisikovurdering

4.1 Produktbeskrivelse og tiltenkte bruksområder

Søknad om godkjenning av maishybriden MON 863 x MON 810 x NK 603 omfatter bruksområdene mat, fôr, næringsmidler, import og prosessering. De genetiske modifiseringene i hybridene gjør planten tolerant overfor angrep fra arter i billeslekten *Diabrotica* og enkelte sommerfuglarter i ordenen Lepidoptera, i tillegg til toleranse for herbicider med virkestoffet glyfosat. NPTII-genet i planten er introdusert som seleksjonsmarkør for identifisering av transformanter under regenerasjonen.

4.2 Effekt av prosessering

Produksjon av ferdige mat og fôrvarer innebærer ofte tøffe behandlinger i bearbeidelsen av råvarene, hvilket er med på å denaturere de fleste proteiner og DNA. Eksempler er koking eller annen oppvarming ved høye temperaturer og/eller trykk, og behandling med lav pH. Det er liten grunn til å anta at ferdige produkter avledet fra mais MON 863 x MON 810 x NK 603 vil være forskjellige fra annen umodifisert mais, eller at proteinene Cry1Ab, Cry3Bb1, CP4 EPSPS og NPTII, eller det innsatte transgenet vil reagere annerledes på foredlingsprosesser enn de fleste proteiner eller DNA generelt. Cry- proteinene er generelt ikke varmestabile proteiner. Imidlertid varierer denatureringstemperaturen mellom forskjellige Cry- proteiner og det kan dermed ikke utelukkes at noen Cry- proteinvarianter tåler høye temperaturer. Denaturerte Cry- proteiner antas ikke å være biologisk aktive.

4.3 Toksikologi

4.3.1 Toksikologisk vurdering av de uttrykte proteinene NPTII, CP4 EPSPS, Cry1Ab og Cry3Bb1

4.3.1.1 *Degradering av NPTII, CP4 EPSPS, Cry1Ab og Cry3Bb1 i fordøyelsesvæske*

Studier viser at NPTII, CP4 EPSPS, Cry1Ab og Cry3Bb1 brytes raskt ned i testsystemer som etterlikner fordøyelse hos pattedyr, det antas derfor at proteinene også brytes raskt ned i menneskets mage- og tarmkanal. Flere studier har blitt publisert hvor man har undersøkt nedbrytning av Cry-proteiner i ulike forsøksdyr. VKM har tidligere vurdert degradering av Cry-proteiner og fordøyelse i forbindelse med helserisikovurdering av Cry-proteiners adjuvanseffekter (VKM 2012).

4.3.1.2 Akutt oral toksisitet

Fôringsforsøk med fremstilt NPTII, CP4 EPSPS, Cry1Ab og Cry3Bb1-protein er dokumentert i søknadene for omsetting av MON 863 x MON 810, MON 863, MON 810 og NK 603 (VKM 2005a, 2005b, 2006, 2007a, 2008). Studiene dokumentert i disse søknadene viser at proteinene NPTII, CP4 EPSPS, Cry1Ab og Cry3Bb1, ikke er akutt toksiske.

4.3.2 Toksikologisk vurdering av MON 863 x MON 810 x NK 603 i hel mat/fôr

4.3.2.1 Fôringsforsøk med rotter:

VKM har tidligere vurdert fôringsforsøk med foreldrelinjene MON 863, MON 810 og NK 603 (VKM 2005b, 2006, 2007a, 2008), utført på både rotter og broilere, i tillegg til hybridene MON 863 x NK 603 og MON 863 x MON 810 x NK 603, men da kun på broiler (VKM 2005a) (sluttføring av søknad C/DE/02/9 i 2009). Studiene viser at fôr som inneholder genmodifisert mais ikke fører til påvisbare negative helseeffekter hos forsøksdyrene.

Ifølge Monsanto er det ikke nødvendig å foreta subkroniske fôringsforsøk med mais fra MON 863 x MON 810 x NK 603 fordi slike forsøk er utført med henholdsvis MON 863, MON 810 og NK 603. Monsanto begrunner bl.a. at ved konvensjonell avl mellom MON 863, MON 810 og NK 603 vil de introduserte egenskapene i mais arves av MON 863 x MON 810 x NK 603. Monsanto påpeker at det kombinerte uttrykket av CP4 EPSPS, NPTII, Cry1Ab og Cry3Bb1 i hybridene ikke vil endre på disse proteinenes egenskaper, og at de er like helsemessig trygge som i foreldrelinjene. Monsanto har utført et 42-dagers fôringsforsøk på broilere som viser ernæringsmessig likhet mellom MON 863 x MON 810 x NK 603 og konvensjonell mais. Studien er omtalt i avsnitt 4.5.1.

4.4 Allergenitet

4.4.1 Vurdering av allergene egenskaper til NPTII, CP4 EPSPS, Cry1Ab og Cry3Bb1

Allergene egenskaper til Cry1Ab, Cry3Bb1, CP4 EPSPS og NPTII har blitt vurdert i VKMs tidligere risikovurderinger av foreldrelinjene MON 810, MON 863, NK 603 og hybridene MON 863 x MON 810 (VKM 2007a, VKM 2008, VKM 2005b, VKM 2009). Basert på dagens litteratur har ingen av de uttrykte proteinene blitt påvist å være allergener eller å ha likheter med kjente allergener.

4.4.2 Adjuvans (fremming av immunreaksjon mot andre stoffer)

Kun Cry1Ab og Cry1Ac har vært eksperimentelt studert med hensyn på adjuvanseffekt.

Cry1Ac er vist i musemodellforsøk å virke som adjuvans via slimhinner ved å stimulere IgM-, IgG- og IgA- produksjon. Spørsmålet er om denne adjuvanseffekten kan føre til økt forekomst av allergi mot andre proteiner via en "bystander"-effekt ved inntak av mat fra genmodifiserte planter som inneholder Cry-proteiner. Dersom Cry3Bb1 og/eller Cry1Ab har tilsvarende adjuvanseffekt som det beslektede Cry1Ac-proteinet er rapportert å ha, vil dette teoretisk kunne føre til økt utvikling av allergi mot matvarer spist sammen med maisen, foruten mot maisen selv. Da ville man kunne forvente at adjuvanseffekten kom til syne først og fremst som økt forekomst av allergi mot de matvarene der matallergi fra før er vanligst. Matallergi mot mais er lite vanlig i Norge, men er et problem i andre områder, bl.a. Nord-Italia. Cry3Bb1 og Cry1Ab brytes derimot raskt ned i magesaft slik at eksponering av tarmepitel for disse proteinene antas å være marginal. Basert på dagens kunnskap mener faggruppen det er lite sannsynlig at Cry-proteiner vil øke det allergiske potensialet til mat/fôr produsert fra MON 863 x MON 810 x NK 603 sammenliknet med konvensjonelle mais sorter (VKM 2012).

4.5 Ernæringsmessig vurdering

Både foreldrelinjene og maishybriden er tidligere vurdert av VKM og ansett som næringsmessig likeverdig til konvensjonell ikke-genmodifisert mais.

4.5.1 Fôringforsøk på broiler:

Søknaden inneholder dokumentasjon fra et 42-dagers fôringforsøk på broilere (Ross x Ross 508) (Taylor *et al* 2004).

800 dyr ble fordelt på åtte grupper á 100 dyr, med 10 bur i hver gruppe, 5 bur pr kjønn. Gruppene ble gitt fôr med mais fra enten MON 863 x MON 810 x NK 603, MON 863xNK 603, konvensjonell kontroll (DKC 46-26) eller en av fem referansesorter (LH176 x LH177 x LH224, DK477, LH295 x LH224, DKC48-83, og LH224 x LH225 x LH295). Alle testfôr ble analysert for pesticidrester og mykotoksiner i forkant av studien, og i følge søker inneholdt ingen av fôrene uakseptable nivåer.

Hver av de åtte test og kontroll-gruppene fikk fôr med 55 % mais fra dag 0 – 21, og 60 % mais fra dag 21 – 42. Alle dyr hadde fri tilgang til fôr og vann gjennom hele studien, og de ble observert daglig for kliniske tegn og/eller dødsfall. Individuell vekt på alle dyr ble målt ved start og slutt. Statistiske beregninger av fôr-inntak, vektøkning, slaktevekt, og kvalitetsvurderinger av kjøtt, fett-innhold etc. ble brukt til å vurdere fôr-effektivitet. Det ble påvist testrelaterte endringer i de målte parameterne, men disse endringene var mellom gruppene gitt fôr med referansemais. For de fleste målte parameterne var det ingen statistisk signifikante forskjeller mellom dyr fôret med mais fra MON 863 x MON 810 x NK

603, konvensjonell kontroll og referansegruppene. Faggruppen konkluderer med at det ikke er grunn til å anta at den ernæringsmessige kvaliteten til den genmodifiserte maisen er forskjellig fra umodifisert mais.

4.6 Konklusjon

En fôringsstudie utført på broilere indikerer ikke helseskadelige effekter av mais MON 863 x MON 810 x NK 603, og studien viser at den er ernæringsmessig lik konvensjonell mais. Proteinene Cry3Bb1, Cry1Ab, CP4 EPSPS og NPTII viser ingen relevante sekvenslikheter med andre kjente toksiner eller IgE-avhengige allergener, og er heller ikke rapportert å ha forårsaket IgE-medierte allergiske reaksjoner. Enkelte studier har derimot indikert at Cry-proteiner potensielt kan forsterke andre allergiske reaksjoner (virke som adjuvans).

Ut i fra dagens kunnskap konkluderer VKMs faggruppe for GMO at mais MON 863 x MON 810 x NK 603 er ernæringsmessig lik konvensjonell mais, og at det er lite sannsynlig at proteinene Cry3Bb1, Cry1Ab, CP4 EPSPS og NPTII vil føre til økt risiko for toksiske eller IgE-medierte allergiske reaksjoner fra mat eller fôr basert på mais MON 863 x MON 810 x NK 603 sammenliknet med konvensjonelle maissorter.

5 Miljørisikovurdering

Søknad om godkjenning av maishybriden MON 863 x MON 810 x NK 603 under forordning 1829/2003/EF og direktiv 2001/18/EF omfatter bruksområdene fôrvarer, næringsmidler, import og prosessering. Søknaden gjelder ikke dyrking. Miljørisikovurderingen av den transgene maislinjen er derfor avgrenset til mulige effekter av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport og prosessering til mat, fôr og 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 frøhvile. 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, veikanter 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 stedege eller introduserte viltvoksende arter i den europeiske flora som mais kan hybridisere med (OECD 2003).

Insektsresistens og herbicidtoleranse kan bare betraktes å være en selektiv fordel for den transgene planten i områder med målorganismen tilstede og der tiltenkte herbicider benyttes.

Overlevelse og spredning av mais til andre habitater i Europa er imidlertid hovedsakelig begrenset av dårlig konkurransevne, manglende frøhvile, 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 de introduserte egenskapene hos MON 863 x MON 810 x NK 603 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 transgene sorter. Dette medfører at mikroorganismer i fordøyelseskanalen hos mennesker og dyr kan eksponeres for rekombinant DNA. Mais har ikke viltvoksende populasjoner eller nærstående arter utenfor dyrking i Europa, og vertikal genoverføring vil være knyttet til krysspollinering med konvensjonelle og eventuelle økologiske sorter.

5.2.1 Horisontal genoverføring (HGT)

En mulig risiko knyttet til maishybrid MON 863 x MON 810 x NK 603 er utilsiktet horisontal spredning av *nptII*-transgenet til sykdomsfremkallende bakterier, og derav nedsatt terapieffekt ved enkelte infeksjoner i husdyrproduksjonen.

Ut fra dagens vitenskapelige innsikt med hensyn til barrierer for genoverføring mellom ubeslektede arter og flere års forskning for om mulig å framprovosere tilfeldig overføring av genetisk materiale fra planter til mikroorganismer er det lite som tyder på at transgenene i MON 863 x MON 810 x NK 603 skal kunne overføres til andre enn plantens naturlige kryssingspartnere (se utfyllende oversikt og vurdering i EFSA 2009; VKM 2005c).

Data fra eksperimentelle studier viser at genoverføring fra transgene planter til bakterier inntreffer svært sjelden, og at denne overføringen forutsetter sekvenshomologi mellom overført DNA og bakteriens genom (EFSA 2009; VKM 2005c).

En forutsetning for HGT fra genmodifiserte planter er at naturlig kompetente bakterier eksponeres til plantens DNA under naturlige forhold. Det er gjort en rekke ulike forsøk som ser på stabilitet av DNA i ulike mat- og fôrkilder samt opptak av dette fra tarmkanalen i ulike organismer (Rizzi et al. 2009). I et forsøk med mus ble stabilitet og opptak av DNA fra tarmkanalen av oralt tilført M13 DNA undersøkt. Det tilførte DNAet var sporbart i avføring opp til syv timer etter fôring. 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 studier av 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 DNA fra GM soya i feces. Denne studien indikerte imidlertid at deler av *epsps*-transgenet hadde blitt tatt opp av tarmbakterier i forsøkspersonene før forsøket startet. Nielsen et al. (2000) og de

Vries & Wackernagel (2002) har undersøkt persistens av DNA og opptak av rekombinant DNA i jord. I disse laboratorieforsøkene ble det påvist svært små mengder DNA som var overført fra planter til bakterier. Forutsetningen for at dette kunne skje var sekvenshomologi mellom plantetransgenet og mottagerbakterien. I hvilken grad det forekommer tilfeldig sekvenshomologi mellom plantetransgener og naturlig forekommende bakterier er usikkert, men siden de fleste transgenene inneholder rekombinerte DNA-sekvenser fra jordbakterier kan dette ikke utelukkes (Bensasson et al. 2004)

Positiv seleksjon er en forutsetning for at sjeldne HGT-begivenheter skal kunne etableres seg i bakteriepopulasjoner tilstede i fordøyelseskanal og/eller miljøet (Pettersen et al. 2005, Townsend et al. 2012). For mange transgener er det ikke sannsynlig at HGT vil gi selektive fordeler eller økt fitness hos mottagerorganismen (Nielsen 2003). Transgener som gir resistens mot antibiotika kan forventes å gi vertsbakterien økt overlevelsessevne under visse miljøbetingelser.

Slike betingelser kan være at bakterien er eksponert både til plantetransgener som gir resistens mot bestemte antibiotika, samt til det antibiotikaet som selekterer for slik egenskap. For plantetransgenet *nptII* som er til stede i MON 863 x MON 810 NK 603 kan enkelte aminoglykosider (e.g. kanamycin og neomycin) positivt selektere for disse; forutsatt at plantetransgenet kan uttrykkes som et funksjonelt protein i den transformerte bakteriens cytoplasma. Aminoglykosidet neomycin, som *nptII*-genet gir resistens mot, benyttes i veterinærmedisin i Norge. Årlig oppdatert oversikt over forbruksdata for aminoglykosider i Norge utarbeides av NORM NORM-VET og kan finnes på Veterinærinstituttets hjemmesider (<http://www.vetinst.no/Publikasjoner/Norm-Vetrapporten>). 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). En temporær positiv seleksjon av eventuelle bakterietransformanter i tarmkanalen til dyr som behandles med slike antibiotika kan derfor ikke utelukkes. Det anses som usannsynlig at gener fra MON 863 x MON 810 x NK 603 vil etableres stabilt i genomet til mikroorganismer i miljøet eller i fordøyelseskanalen hos mennesker eller dyr uten et slikt seleksjonstrykk.

Ut fra tilgjengelig kunnskap er det ikke grunn til å forvente at det vil forekomme påvisbare horisontale genoverføringer av DNA-materiale fra MON 863 x MON 810 x NK 603 i mikrobiologiske prøver fra miljøet (Heinemann & Traavik 2004; Nielsen & Townsend 2004). Dette skyldes at slik overføring er forventet å være så lavfrekvent at de enten ikke forekommer i et gitt miljø og tidsperiode eller at de forekommer ved så lav prevalens at de ikke kan påvises ved tilgjengelig metodologi (Heinemann & Traavik 2004; Nielsen & Townsend 2004). Det er tidligere påpekt store metodologiske utfordringer ved en slik påvisning (Heinemann & Traavik 2004; Nielsen & Townsend 2004; Townsend et al. 2012).

Antibiotikaene som *nptII* gir resistens imot er klassifisert av European Medicines Agency (EMA 2007) og WHO (2005) som "highly important" og "cannot be classified as of no or minor therapeutic relevance" og VKMs GMO-panel anser derfor enhver økning av

resistensnivået til disse antibiotikaene som uønsket. Risikoen knyttet til bruk av *nptII*-genet i MON 863 x MON 810 x NK 603 kan derfor betraktes isolert sett i forhold til bruksområde til MON 863 x MON 810 x NK 603, eller som et element i en større vurdering av antibiotikaresistenssituasjonen der en samlet ønsker å begrense kilder og muligheter for utvikling av resistens i patogene bakteriepopulasjoner.

En så langt hypotetisk forekomst av HGT fra MON 863 x MON 810 x NK 603 til bakterier som eksponeres til denne plantens DNA må sees i sammenheng med prevalensen av *nptII*-genet i norsk miljø. Hvis *nptII*-genet allerede finnes utbredt i miljø som vil eksponeres til MON 863 x MON 810 x NK 603 er det høyst usannsynlig at sjeldne HGT-begivenheter fra MON 863 x MON 810 x NK 603 vil endre resistensnivået.

Det er lite informasjon tilgjengelig om forekomst av *nptII*-genet i relevante miljøet i Norge. Søker har heller ikke vedlagt slik informasjon. Overvåkning av resistenssituasjonen i Norge (se årlig NORM NORM-VET publikasjon) viser at forekomsten av aminoglykosidresistens og derav *nptII*-genet er lav i patogene bakterier i Norge. Forekomst av kanamycin/neomycin-resistens er beskrevet i *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* og *Staphylococcus intermedius* fra svin, svinefaeces, kalkunfaeces, storfekjøtt, hund og hundefaeces i Norge. Forekomsten av resistente isolater varierte mellom 1 til 10 % (NORMVET rapportene 2004-2007). Imidlertid gir disse observasjonene ikke grunnlag for å bestemme hvilke resistensgener som forårsaker den fenotypiske resistensen i disse isolatene. Det understrekes at kunnskap om forekomsten av *nptII*-genet i norske miljø er mangelfull.

EFSA og VKM har tidligere utredet problemstillingen rundt mulig HGT av antibiotikaresistensmarkørgener i detalj (EFSA 2004, 2009; VKM 2005c), og konkludert med at bidraget av *nptII*-genet fra mat og fôr produsert fra genmodifiserte planter ikke er en signifikant kilde til resistensgener i bakterier som lever i tarmen til mennesker og dyr. Konklusjonen var basert på lav sannsynlighet for HGT, samt et eksisterende nivå av *nptII*-gener i miljøet. Den geografiske utbredelsen av antibiotikaresistens i Europa varierer mellom land og vurderingene gjort i disse tidligere publikasjonene er ikke basert på faktisk forekomst av *nptII*-genet i Norge. Det foreligger ikke vitenskapelig litteratur som indikerer at forekomsten av *nptII*-genet i Norge er utbredt.

5.2.2 Vertikal genoverføring

Potensialet for krysspollinering mellom maishybriden MON 863 x MON 810 x NK 603 og konvensjonelt foredlete maissorter vil avhenge av omfanget av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport, handtering 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.

Insektsresistens kan bare betraktes å være en selektiv fordel på arealer der målorganismene er til stede under dyrking. Denne egenskapen vil imidlertid ikke representere økt

sannsynlighet for spredning av mais i Europa. Overlevelse hos mais er i hovedsak begrenset av dårlig konkurranseevne, manglende frøhvile, mottagelighet for soppsykdommer og liten frosttoleranse. Som for konvensjonelle sorter er det ingenting som tilsier at eventuelle spillplanter vil overleve til neste vekstsesong eller etablere uønskede populasjoner i Norge.

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

5.3 Potensiale for samspill mellom GMP og målorganismer

Maislinjen MON 863 x MON 810 x NK 603 er transformert med *cry3Bb1*- og *cry1Ab*-genene fra jordbakterien *Bacillus thuringiensis*, henholdsvis subsp. *kumamotoensis* og subsp. *kurstaki*.

Cry3Bb1-proteinet gir plantene resistens mot angrep fra skadegjørere i billeslekten *Diabrotica*, eksempelvis *D. virgifera virgifera* ('Western Corn Rootworm'), *D. barberi* ('Northern Corn Rootworm') og *D. undecimpunctata howardi* ('Southern Corn Rootworm'). *D. virgifera virgifera* er det eneste målinsektet for MON 863 som er påvist i Europa (Crop Protection Compendium 2007). Arten er en betydelig skadegjører i mais på det amerikanske kontinent, men ble først påvist i Europa (Serbia) i 1992. Den siste 15-årsperioden har arten etablert seg i flere land i Sentral-Europa, og det er også rapportert om funn av *D. virgifera virgifera* i Frankrike, Italia, Nederland og Storbritannia (Crop Protection Compendium 2007). Planteskadegjøreren har allerede medført betydelige avlingstap i enkelte regioner, og spredningen skjer svært raskt, spesielt i områder med intensiv maisdyrking. Insektet overvintrer i planterøttene, og områder med monokulturer av mais og arealer der det ikke praktiseres vekstskifte er spesielt utsatte. Det har ikke vært rapportert om funn av *D. virgifera virgifera* i Norge (<http://www.faunaeur.org/distribution.php>).

Cry1Ab-proteinet i MON 810 gir plantene resistens mot angrep fra enkelte arter i ordenen Lepidoptera, eksempelvis *Ostrinia nubilalis* (maispupalide) og *Sesamia* ssp. I Norge er det registrert enkeltfunn av maispupalide i Vestfold, Telemark og Agder, men arten er ikke rapportert som skadegjører. Det er ikke gjort observasjoner av *Sesamia*-arter i Norge.

Tatt i betraktning tiltenkt bruksområde for maislinjen, vil miljøeksponeringen være begrenset til sporadiske enkeltplanter fra frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Nivået av eksponering av Bt-toksin for eventuelle målorganismer vil derfor være svært lav, og ikke ha noen økologisk betydning i Norge.

5.4 Potensiale for samspill mellom GMP og ikke-målorganismer

Sporadiske spillplanter av maishybrid MON 863 x MON 810 x NK 603 med opphav i utilsiktet frøspredning under ulike omsetningsledd antas ikke å medføre risiko for ikke-målorganismer.

Når det gjelder indirekte eksponering gjennom gjødsel fra husdyr fôret med genmodifisert mais vil mesteparten av Cry-proteinene denatureres av enzymaktivitet (proteaser) i fordøyelseskanalen, og mikrobielle prosesser vil føre til en ytterligere nedbryting av proteinet i gjødsla. Dette medfører at svært lite Cry-proteiner blir spredt med husdyrgjødsel på dyrket mark, noe som igjen minimerer faren for eksponering av potensielt sensitive ikke-målorganismer. Spredning av Cry-toksinet via gjødsel antas derfor ikke å gi signifikante miljøeffekter.

5.5 Konklusjon

Antibiotikaresistens

Risikoen for mulig spredning av *nptII*-genet fra MON 863 x MON 810 x NK 603 og derav nedsatt terapieffekt ved enkelte infeksjoner i husdyrproduksjon antas å være lav grunnet begrenset mulighet for positiv seleksjon av svært sjeldne tilfeller av horisontal genoverføring (HGT) fra plante til bakterie. Eventuell forekomst av slike HGT-begivenheter må sees i sammenheng med eksisterende prevalens av aminoglykosid resistens og *nptII*-genet i relevante norske miljø.

Det påpekes at datagrunnlaget vedrørende forekomst av *nptII*-genet i Norge er svært begrenset. Oppdaterte data fra NORM-NORM-VET-overvåkingen av resistenssituasjonen i Norge indikerer imidlertid lav forekomst av *nptII*-genet. Den veterinære bruken av aminoglykosidet neomycin, er slik at disse kan gi selektive fordeler for bakterie-transformanter som har tatt opp *nptII*-transgenet, hvis dette uttrykkes funksjonelt i bakterien.

Antibiotikaene som *nptII*-genet gir resistens imot er klassifisert av European Medicines Agency (EMA 2007) og WHO (2005) som «highly important».

Øvrig miljørisiko

Søknad EFSA/GMO/UK/2004/07 gjelder godkjenning av maishybrid MON 863 x MON 810 x NK 603 til import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av maisen.

Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av maislinjen i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Risiko for utkryssing med dyrkede sorter vurderes til å være ubetydelig. Ved foreskrevet bruk av maislinjen MON 863 x MON 810 x NK 603 antas det ikke å være risiko for negative effekter på målorganismer, ikke-målorganismer (med mulig unntak av patogene mikrober) eller på abiotisk miljø i Norge.

6 Kunnskapshull

- Det er kunnskapshull knyttet til forekomsten av *nptII*-genet i Norge og Europa.
- Det er kunnskapshull knyttet til i hvilken grad det er sammenhengen mellom HGT-frekvenser og klinisk effekt av bakteriepopulasjoner som bærer nye HGT-eventer.
- Det er kunnskapshull knyttet til vurderinger av adjuvans (VKM 2012). Det er kunnskapshull knyttet til rester av sprøytemidler i herbicidtolerante planter
- Det er kunnskapshull knyttet til rester av sprøytemidler i herbicidtolerante planter

7 Konklusjoner

Molekylær karakterisering

Southern analyser viser at de rekombinante gensekvensene som er satt inn i maislinjene MON 863, MON 810 og NK 603 er bevart i den kryssede maishybriden MON 863 x MON 810 x NK 603. Genetisk stabilitet av de innsatte sekvensene har tidligere blitt vist for MON 863, MON 810 og NK 603. Nivåene av uttrykt Cry3Bb1-, Cry1Ab- og CP4 EPSPS – protein målt i korn og vegetativt vev fra mais MON 863 x MON 810 x NK 603 samsvarer med nivåene målt i de respektive foreldrelinjene. Nivået av NPTII-protein var under deteksjonsgrensen for analysene. VKMs faggruppe for GMO anser den molekylære karakteriseringen av mais MON 863 x MON 810 x NK 603 som tilfredsstillende.

Komparative analyser

Komparative analyser av mais MON 863 x MON 810 x NK 603 og konvensjonell kontroll ble utført av søker under feltforsøk i Argentina vekstsesongen 2002-2003. Tretten konvensjonelle maissorter var inkludert i feltforsøkene og brukt som referanser. Med unntak av små variasjoner, insekts-resistens og herbicidtoleransen mediert av Cry3Bb1, Cry1Ab og CP4 EPSPS -proteinene, viste resultatene ingen biologisk relevante forskjeller mellom maishybriden MON 863 x MON 810 x NK 603 og konvensjonell kontroll.

Basert på gjennomgangen av tilgjengelige data konkluderer VKMs faggruppe for GMO at mais MON 863 x MON 810 x NK 603 er vesentlig lik konvensjonell kontroll med hensyn til næringsstoffsammensetning og agronomiske og fenotypiske egenskaper, med unntak av de nye proteinene.

Helserisikovurdering

En fôringsstudie utført på broilere indikerer ikke helseskadelige effekter av mais MON 863 x MON 810 x NK 603, og studien viser at den er ernæringsmessig lik konvensjonell mais. Proteinene Cry3Bb1, Cry1Ab, CP4 EPSPS og NPTII viser ingen relevante sekvenslikheter med andre kjente toksiner eller IgE-avhengige allergener, og er heller ikke rapportert å ha forårsaket IgE-medierte allergiske reaksjoner. Enkelte studier har derimot indikert at Cry-proteiner potensielt kan forsterke andre allergiske reaksjoner (virke som adjuvans).

Ut i fra dagens kunnskap konkluderer VKMs faggruppe for GMO at mais MON 863 x MON 810 x NK 603 er ernæringsmessig lik konvensjonell mais, og at det er lite sannsynlig at proteinene Cry3Bb1, Cry1Ab, CP4 EPSPS og NPTII vil føre til økt risiko for toksiske eller IgE-medierte allergiske reaksjoner fra mat eller fôr basert på mais MON 863 x MON 810 x NK 603 sammenliknet med konvensjonelle maissorter.

Miljørisiko

Antibiotikaresistens

Maishybriden MON 863 x MON 810 x NK 603 inneholder antibiotikasresistensmarkørgenet *nptII*.

Faggruppen konkluderer med at risikoen for nedsatt terapieffekt ved enkelte infeksjoner i husdyrproduksjon forårsaket av spredning av *nptII*-genet fra maishybriden antas å være lav. Dette grunnet begrenset mulighet for positiv seleksjon av bakterier etter sjeldne tilfeller av horisontal genoverføring (HGT) fra plante til bakterie. I tillegg er det variabel forekomst av andre aminoglykosid-resistens determinanter i relevante bakteriepopulasjoner.

Det påpekes videre store forskjeller i geografisk utbredelse av antibiotikaresistens i Europa, og at det mangler publisert dokumentasjon på forekomsten av *nptII*-genet i Norge. Det foreligger ikke vitenskapelig litteratur som indikerer at forekomsten av *nptII*-genet i Norge er utbredt. Det påpekes også at neomycin benyttes i norsk landbruk, og at et seleksjonstrykk på eventuelle sjeldne transformanter (bakterier som har tatt opp og inkorporert *nptII*-genet i eget genom) derfor ikke kan utelukkes.

Øvrig miljørisiko

Søknad EFSA/GMO/UK/2004/07 gjelder godkjenning av maishybrid MON 863 x MON 810 x NK 603 til import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av maisen.

Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av maislinjen i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Risiko for utkryssing med dyrkede sorter vurderes til å være ubetydelig. Ved foreskrevne bruk av maislinjen MON 863 x MON 810 x NK 603 antas det ikke å være risiko for negative effekter på målorganismer, ikke-målorganismer (med mulig unntak av patogene mikrober) eller på abiotisk miljø i Norge.

Samlet vurdering

Ut i fra dagens kunnskap konkluderer VKMs faggruppe for GMO, at maishybriden MON 863 x MON 810 x NK 603 er vesentlig lik konvensjonell kontroll med hensyn til næringsstoffsammensetning og ernæringsmessige, agronomiske og fenotypiske egenskaper, med unntak av de nye proteinene. Det lite sannsynlig at proteinene Cry1Ab, Cry3Bb1, CP4 EPSPS og NPTII vil føre til økt risiko for toksiske eller IgE-medierte allergiske reaksjoner fra mat eller fôr basert på mais MON 863 x MON 810 x NK 603 sammenliknet med konvensjonelle maissorter.

Risikoen for nedsatt terapi effekt ved enkelte infeksjoner knyttet til husdyrproduksjon forårsaket av eventuell spredning av *nptII*-genet fra MON 863 x MON 810 x NK 603 antas av faggruppen å være lav. Det påpekes store forskjeller i geografisk utbredelse av antibiotikaresistens i Europa, og at det mangler publisert dokumentasjon på naturlig forekomst av *nptII*-genet i Norge. En positiv seleksjon av eventuelle sjeldne transformanter (bakterier som har tatt opp og inkorporert *nptII*-genet fra mais MON 863 x MON 810 x NK 603 i eget genom) kan derimot ikke utelukkes ettersom neomycin brukes i norsk landbruk. Forekomsten av slike sjeldne transformante bakterier må også ses i sammenheng med den naturlige forekomsten av *nptII*-genet og andre antibiotikaresistensgener som allerede eksisterer blant bakteriepopulasjoner i relevante norske miljøer.

VKMs faggruppe for genmodifiserte organismer finner det lite trolig at den omsøkte bruken av mais MON 863 x MON 810 x NK 603 vil medføre endret risiko for miljøet for øvrig i forhold til konvensjonell mais.

8 Referanser

- Bensasson D, Boore JL, Nielsen KM (2004) Genes without frontiers. *Heredity* 92: 483-489
- Borovkov IG, Jennings JC, Lirette RP (2001) Amended report for MSL16776: Confirmation of the genomic DNA sequence flanking the 5' and 3' ends of the insert in YieldGard corn event MON 810. Monsanto Technical Report MSL 17074.
- CERA (2012) Center for Environmental Risk Assessment. GM Database for safety information. http://cera-gmc.org/index.php?action=gmc_crop_database
- Crop Protection Compendium (2007) <http://www.cabicompendium.org/cpc/home.asp>
- de Vries J, Wackernagel W (2002) Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99: 2094-2099.
- EFSA (2004) Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. *The EFSA Journal* 48: 1-18.
http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_opinions/384.html
- EFSA (2005) Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on an application (EFSA/GMO/UK/2004/07) for the placing on the market of insect protected glyphosate tolerant genetically modified maize MON 863 x MON 810 x NK 603 for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 by Monsanto. *The EFSA Journal* 256: 1-25
- 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. ISBN: 92-9199-019-1. European Food Safety Authority, Parma, Italy. 100 p.
http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_guidance/660.html
- EFSA (2009) Use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. Scientific Opinion of the Panel on Genetically Modified Organisms (GMO) and the Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *The EFSA Journal* 1034: 1-82.
http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Statement/gmo_biohaz_st_ej1108_ConsolidatedARG_en.pdf?ssbinary=true
- EFSA (2010) Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. Scientific opinion from the EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). *EFSA Journal* 8 (11):1-111.
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1879.pdf>

- EFSA (2011) Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. Scientific opinion from the EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). The EFSA Journal 9(5): 2150.
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2150.pdf>
- EMEA (2007) Presence of the antibiotic resistance marker gene nptII in GM plants for food and feed uses.
EMEA/CVMP/56937/2007http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2010/01/WC500054091.pdf
- Hallauer AR (2000) Potential for outcrossing and weediness of genetically modified insect protected corn. APHIS-USDA.
- Heinemann JA, Traavik T (2004) Problems in monitoring horizontal gene transfer in field trials of transgenic plants. Nat Biotechnol 22: 1105–1109 doi: 10.1038/nbt1009
- Hernández M, Pla M, Esteve T, Prat S, Puigdomènech P, Ferrando A (2003). A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON 810 in maize YieldGard® based on the 3´-transgene integration sequence. Transgenic Research, 12, 179-189.
- Holck A, Va M, Didierjean L, Rudi K (2002) 5'-Nuclease PCR for quantitative event-specific detection of the genetically modified MON 810 MaisGard maize. Eur Food Res Technol 214, 449–453.
- Lid J, Lid DT (2005) Norsk flora. Det Norske Samlaget, Oslo. 7. utgave. ISBN: 82-521-6029-8. 1230s.
- Netherwood T, Martín-Orúe SM, O'Donnell AG, Gockling S, Graham J, Mathers JC, Gilbert HJ. (2004) Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. Nature Biotechnology 22: 204-209.
- Nielsen KM, van Elsas JD, Smalla K (2000) Transformation of *Acinetobacter* sp. BD413 (pFG4deltanptII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. Applied Environmental Microbiology 66: 1237-1242.
- Nielsen K (2003) An assessment of factors affecting the likelihood of horizontal transfer of recombinant plant DNA to bacterial recipients in the soil and rhizosphere. Collection of Biosafety Reviews (Italy) 1: 96-149.
- Nielsen KM, Townsend JP. (2004) Monitoring and modeling horizontal gene transfer. Nature Biotechnology 22(9): 1110-1114.

- Nordgård L, Brusetti L, Raddadi N, Traavik T, Averhoff B, Nielsen KM (2012) An investigation of the potential of horizontal transfer of feed introduced DNA to the microbiota of the gastrointestinal tract of rats. *BMC Res. Notes* 5: 170.
- 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).
- Petterson A K, Primicero R, Bøhn T, Nielsen KM (2005) Modeling suggests frequency estimates are not informative for predicting the long-term effect of horizontal gene transfer in bacteria. *Environ. Biosafety Res* 4: 222–233 doi: 10.1051/ebr:2006008.
- Ridley WP, Nemeth MA, Riordan SG, Trujillo WA and Sorbet RD (2004)
Compositional analysis of corn forage and grain collected from MON 863 x NK 603 x MON 810 and MON 863 x NK 603 grown in Argentina field trials during 2002-2003.
Monsanto Technical Report, MSL 19157.
- Rizzi A, Raddadi N, Sorlini C, Nordgård L, Nielsen KM, Daffonchio D (2012) The stability and degradation of dietary DNA in the gastrointestinal tract of mammals - implications for horizontal gene transfer and the biosafety of GMOs. *Crit Rev Food Science Nutr* 52: 142-161.
- Scanlon NK, Masucci JD, Jennings JC (2007) Amended report for MSL 18784: additional southern blot and sequencing analysis of YieldGard cornborer corn MON 810. Monsanto Technical Report, MSL 0020709.
- Schubbert GW, 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.
- Taylor ML, Hyun Y, Hartnell GF, Nemeth MA, Karunanandaa K, and Glenn KC (2004)
Comparison of broiler performance and carcass parameters when fed diets containing MON 863 x MON 810 x NK 603, MON 863 x NK 603, non-transgenic control or commercial corn. Monsanto Technical Report, MSL 18762.

- Townsend J P, Bøhn T, Nielsen K M (2012) Probability of detecting horizontal gene transfer in bacterial populations. *Front Microbiol* 3, art. 27
- VKM (2005a) Helserisikovurdering av genmodifisert mais MON 863 x MON 810 x NK 603 (EFSA/UK/2004/07). Uttalelse fra Faggruppen for genmodifisert organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet 4.4.2005.
- VKM (2005b) Helserisikovurdering av NK 603 (C/EC/00/01) etter ny mat forordning 258/97/EF. Uttalelse fra Faggruppen for genmodifisert organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet 8.3.2005.
- VKM (2005c) Report from an Ad Hoc Group appointed by the Norwegian Scientific Panel on Genetically Modified Organisms and Panel on Biological Hazards – An assessment on potentially long-term health effects caused by antibiotic resistance marker genes in genetically modified organisms based on antibiotic usage and resistance patterns in Norway. Opinion 05/302-1-final. Norwegian Scientific Committee for Food Safety, Oslo, Norway. 62 p.
- VKM (2006) Uttalelse om Monsanto's genmodifiserte mais (C/DE/02/9). Uttalelse fra Faggruppen for genmodifisert organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet 16.1.2006.
- VKM (2007a) Helserisikovurdering av genmodifisert mais MON 810, C/DE/02/9. Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer 30.1.2007 (06/312-endelig). Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.
- VKM (2007b) Miljørisikovurdering av genmodifisert mais MON 810, C/DE/02/9. Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer 9.11.2007 (07/320-endelig). Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.
- VKM (2008) Helse- og miljørisikovurdering av genmodifisert mais MON 863 fra Monsanto Company (C/DE/02/9). Uttalelse fra Faggruppen for genmodifisert organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet 28.11.2008.
- VKM (2012) Helserisikovurdering av Cry-proteiners adjuvanseffekt. Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer 25.4.2012 -11/313/3-endelig. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge. [Lenke](#)
- VKM (2013) Endelig miljørisikovurdering av genmodifisert maishybrid MON 863 x MON 810 x NK 603 til mat, fôr, import og prosessering under forordning 1829/2003/EF (EFSA/GMO/UK/2004/07)
- WHO (2007) Critically important antimicrobials for human medicine: Categorization for the development of risk management strategies to contain antimicrobial resistance due to nonhuman antimicrobial use. Report of the second WHO expert meeting, Copenhagen, 29 31 May 2007