



UTTALELSE OM PIONEER HI-BRED/MYCOGEN SEEDS GEN-MODIFISERT MAIS 1507x59122 (EFSA/GMO/NL/2005/15)

Vurdert og godkjent av Faggruppe for genmodifiserte organismer

DATO: 22.09.07

SAMMENDRAG

Vurderingen av den genmodifiserte herbicidresistente og insektstolerante maislinjen 1507x59122 fra Pioneer Hi-Bred/Mycogen Seeds er utført av Faggruppe for genmodifiserte organismer under Vitenskapskomiteen for mattrygghet. Mattilsynet (MT) ber Vitenskapskomiteen for mattrygghet om å vurdere den genmodifiserte maislinjen 1507x59122 til bruk i næringsmidler og fôrvarer.

Hybriden 1507x59122 er fremkommet ved konvensjonell kryssing mellom Pioneers genmodifiserte mais 1507 og Pioneers genmodifiserte mais 59122. Begge to er tidligere riskikovurdert av VKM. Handelsnavnet i USA er Herculex XTRA. Hensikten med 1507x59122 er motstandsdyktighet mot enkelte insektsarter og toleranse mot sprøytemidler som inneholder virkemidlene glufosinat.

Vurdering av den genmodifiserte maisen er basert på den dokumentasjonen som er gjort tilgjengelig på EFSA's nettside GMO EFSA.net. Maisen 1507x59122 er vurdert i henhold til tiltenkt bruk og de prinsipper som er lagt til grunn i EFSA's retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter (EFSA 99, 2004), samt EFSA's oppdatering for hybrider (The EFSA Journal (2007)) og Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) konsensusdokument for mais (OECD 2002). Den vitenskapelige vurderingen omfatter transformeringsprosessen, bruk av vektor og det transgene konstruktet, komparativ analyse av ernæringsmessig kvalitet, mineraler, kritiske toksiner, antinæringsstoffer, allergener og nye proteiner.

Analysene av ernæringsmessige viktige komponenter ble vurdert. Det ble bemerket at noen av de komponenter som OECDs konsensusdokument (OECD 2002) anbefaler analysert for mais, ikke er utført. Det er funnet statistiske forskjeller for enkelte komponenter. De statistiske forskjellene for disse komponentene er ikke konsistente da forskjellene som er påvist i enkelte forsøksfelt, ikke er påvist i de andre forsøksfeltene. Faggruppen anser analysene for å være tilstrekkelige for en vurdering av linje 1507x59122 til bruk som mat og fôr.

Maislinjen inneholder ikke antibiotikaresistensgener.

Informasjon vedrørende allergenisitet viser at for de parametre som er målt, har ikke de uttrykte proteinene likheter med kjente allergener eller egenskaper som tilsier at de er

allergener. Det er imidlertid ikke vurdert om det uttrykte toksinene Cry1F, Cry34Ab1 og Cry35Ab1 kan ha adjuvanseffekter, det vil si øke utviklingen av allergisk respons mot andre proteiner.

”Faggruppen finner det vanskelig å vurdere om næringsmidler og fôrvarer fra maisen 1507x59122 er mer allergifremkallende enn næringsmidler og fôrvarer fra umodifisert maiskorn. På bakgrunn av foreliggende eksperimentelle studier i mus, finner Faggruppen imidlertid at muligheten for økt allergifremkallende aktivitet hos næringsmidler og fôrvarer fra 1507x59122 i forhold til umodifisert mais med den informasjon vi har tilgang til, ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes. Faggruppen mener at siden adjuvanseffekt av Cry34Ab1, Cry35Ab1 og Cry1F ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes må det kreves av Pioneer Hi-Bred å kommentere forsøkene som viser adjuvanseffekt av Cry1Ac i forhold til muligheten for adjuvanseffekt av Cry34Ab1, Cry35Ab1 og Cry1F.”

NØKKELORD

Genmodifisert mais, 1507x59122, EFSA/GMO/NL/2005/15, insektsresistens, herbicid-toleranse, PAT, Cry34Ab1, Cry35Ab1, Cry1F, glufosinat, helsemessig trygghet, helse.

BAKGRUNN

Faggruppe for genmodifiserte organismer under Vitenskapskomiteen for mattrygghet er blitt bedt av Mattilsynet om en vitenskapelig risikovurdering av EFSA/GMO/NL/2005/15 genmodifisert mais (1507x59122) til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Vurdering av den genmodifiserte maisen er basert på den dokumentasjonen som er gjort tilgjengelig på EFSA's nettside GMO EFSA.net. Mais 1507x59122 er vurdert i henhold til tiltenkt bruk og de prinsipper som er lagt til grunn i EFSA's dokument ”Guidance document of the scientific panel of genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed” (EFSA 99, 2006). Ved vurdering av vesentlig likhet har Faggruppen lagt vekt på OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002) og dens anbefaling av hvilke parametre som bør undersøkes.

I henhold til Vitenskapskomiteen for mattrygghets uttalelse på møtet 23. april 2004 har Faggruppe for genmodifiserte organismer vedtatt at i de sakene hvor EFSA har kommet med sine uttalelser før Faggruppe for genmodifiserte organismer får sakene til behandling, skal søknadene behandles på samme måte som i EU-landene, dvs. ved en noe forenklet risikovurdering. Det vil imidlertid bli tatt hensyn til særnorske forhold der slike kan påvises.

Det er kun medlemmene i Faggruppen som har vurdert den genmodifiserte maisen.

OPPDRAG FRA MATTILSYNET

I sitt brev ber Mattilsynet Vitenskapskomiteen for mattrygghet om å vurdere den genmodifiserte maisen. Bruksområdet som søknaden gjelder for er import, prosessering, næringsmidler og fôrvarer i henhold til EUs Forordning (EC) nr. 1829/2003, artiklene 3(1)(c), 15(1)(c) og direktiv 2001/18/EØF. Søknaden gjelder ikke for kultivering, og krever derfor ikke vurdering for miljørisiko i henhold til Direktiv 2001/18/EØF. Mattilsynet ber VKM om vurdering av helseaspekter ved disse produktene, og legge risikovurderingen inn på EFSA.net, og sende kopi av vurderingen til Mattilsynet.

Produktet som ønskes vurdert er:

Genmodifisert mais, EFSA/GMO/NL/2005/15 (1507x59122). Unik kode er DAS-Ø15Ø7-1xDAS-59122-7.

Status i EU: Søknad under 1829/2003/EF. EFSA's frist for innspill er 15.10.07.

RISIKOVURDERING

Innledning

Den genmodifiserte maishybriden 1507x59122 ble vurdert ut fra Mattilsynets oppdrag. I henhold til Pioneer Hi-Bred er søknaden kun for import og bruk som næringsmidler, fôrvarer og industrielle produkter, ikke for utsetting. Primærbruken av maiskorn i Norge i dag er til dyrefôr, men mais brukes også til industriell produksjon av etanol, maismel, popkorn, raffinert stivelse og søtningsprodukter.

Faggruppe for genmodifiserte organismer har på faggruppemøtet 02.02.05 vedtatt å bruke EFSA's retningslinjer som gruppens retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter. Prinsippene som er lagt til grunn for vurderingen, er derfor hentet fra EFSA's dokument "Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed" (EFSA 99, 2006).

Faggruppe for genmodifiserte organismer vurderer søknaden om markedsføring av genmodifisert mais (EFSA/GMO/NL/2005/15) til bruk i næringsmidler og fôrvarer under forordning 1829/2003.

Bakgrunnsinformasjon

Beskrivelse av de innsatte genene:

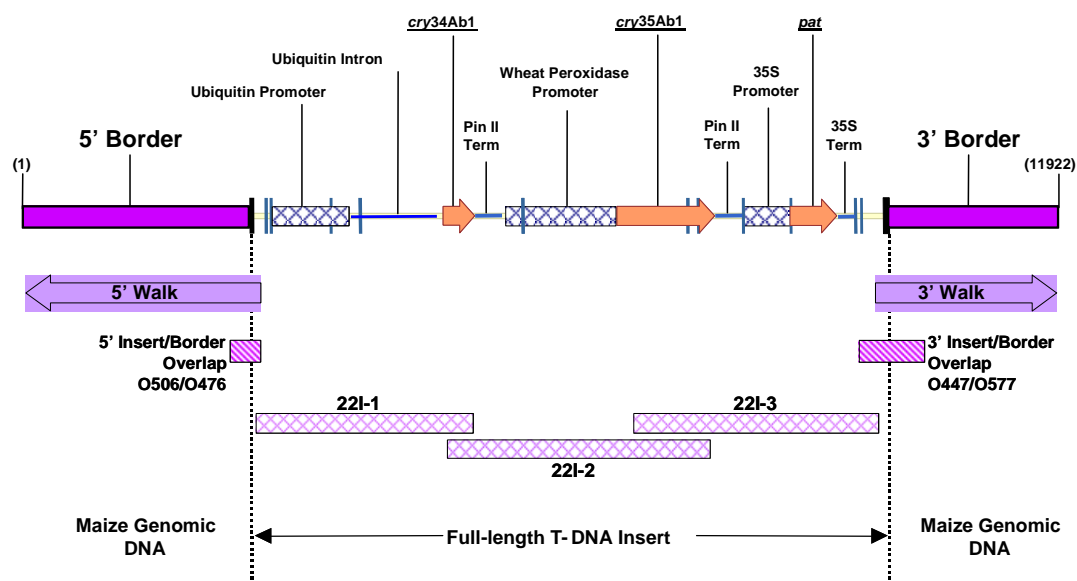
Mais 59122 (foreldrelinje):

Den genmodifiserte maislinjen 59122 uttrykker glufosinat- og insektstoleranse ved at et lineært DNA fragment på 7390 basepar fra den binære vektoren PHP17662, ble overført til embryomaisceller med *Agrobacterium*-mediert transformasjon. DNA-fragmentet inneholder ikke antibiotikaresistensgen. Dette DNA fragmentet inneholder følgende gener og DNA elementer (se figur 1):

- a) *ubi1ZM* promoter fra mais, omfatter 5'UTR og intron
- b) *cry34Ab1* gen fra *Bacillus thuringiensis* strain PS149B1. Genet er optimalisert for uttrykk i mais.
- c) *pinII* terminator, kommer fra potetproteinase inhibitor II genet.
- d) *ta* promoter fra hvete peroksidasegenet.
- e) *cry35Ab* gen fra *Bacillus thuringiensis* strain PS149B1. Genet er optimalisert for uttrykk i mais.
- f) *pinII* terminator, kommer fra potetproteinase inhibitor II genet.
- g) *pat* genet stammer fra jordbakterien *Streptomyces viridochromogenes*. *Pat* genet uttrykker enzymet fosfotricin acetyltransferase (PAT, phosphinothricin acetyl transferase) som har høy spesifisitet overfor fosfotricin, som er den aktive komponenten i herbicider av glufosinat-typen. PAT inaktiverer fosfotricin ved N-acetylering og

- beskytter derved planten i et fosfinotricinmiljø. Basesekvensene i genet er endret slik at genet kan uttrykkes i planter. PAT proteinets aminosyresekvens i planten er lik bakterieproteinets aminosyresekvens.
- h) CaMV 35S: Promoteren CaMV 35S og terminatoren CaMV 35S kommer fra blomkål mosaikkvirus. Promoteren styrer uttrykket av *pat*. Termineringen av uttrykket styres av 35S Term.

Figur: T-DNA rekombinant fragmentet fra det binære PHP17662 plasmidet med genomiske flankesekvenser.



Figur 1:

Figuren viser et genomisk DNA fragment på 11922 bp hvor T-DNA rekombinant fragment sitter. PCR-fragmentene 22I-1, 22I-2 og 22I-3 er T-DNA-fragmenter som er sekvensert. 5'Walk og 3'walk er sekvenserte genomiske områder på henholdsvis 2593 bp og 1986 bp.

Karakterisering av geninnsettingen

Southern blot- og sekvensanalyse viser at et nesten fullengde kopi av PHP17662 rekombinante DNA-fragment (7343 bp fra 7390 bp fragmentet) er satt inn i maisens genom. Det er kuttet bort 22 bp fra 5'- og 25 bp fra 3'-delen av DNA fragmentet. Et 11922 bp genomisk DNA-fragment fra mais DAS-59122-7 hvor det rekombinante DNA fragmentet ligger på, er sekvensert. Dette DNA-fragmentet inneholder alle genene (*pat*, *cry34Ab1* og *cry35Ab1*) og de respektive regulatoriske sekvensene. Det er også funnet to base-endringer i fragmentets ikke-kodende område. Ingen av disse endringene påvirker fragmentets åpne leseramme. Det er sekvensert 2593 bp og 1986 bp henholdsvis fra 5'- og 3'-flankesekvenser. Det er funnet små områder med sekvenslikheter med f.eks. kromosomale sekvenser og forskjellige ESTer. Det største området er på 179 bp. Ingen av flankeområdene har likheter med kodende sekvenser for kjente proteiner.

Western blot og påvisning med polyklonale antistoffer viser at både Cry34Ab1, Cry35Ab1 og PAT proteinene har de forventede molekylvektene. Cry35Ab1 forelå som dublett i Western-blott, størrelse 44 kD og 40kD. Tilsvarende bånd ble påvist med bakterie-Cry35Ab1 protein.

Årsaken oppgis å være at planteproteaser spalter av et C-terminalt fragment. Det er ingen indikasjoner på fusjonsproteiner. Cry34Ab1 og Cry35Ab1 ble påvist i blad, pollen, korn, stilk og hel plante. PAT ble påvist i blad, rot og stilk.

Påvisning av åpne leserammer (ORF)

Det er gjort studier for å påvise kodende sekvenser. Det er ikke påvist åpne leserammer som kan føre til uttrykk av peptider som er større enn 100 aminosyrer.

Den genmodifiserte maisen ble krysset med den innavlede linjen PH098B for å danne F1 generasjonen. F1 er selvpollinert 2 ganger, T1S1 og T1S2 generasjon. F1 ble krysset med og tilbakekrysset for å danne BC1 generasjon. Flere forskjellige kryssninger har dannet fire forskjellige 59122 generasjonene T1S1, T1S2, BC1 og BC2S1. Disse fire generasjonene ble undersøkt med Southern blot analyse. Analysene viser at det rekombinante DNA fragmentet er stabilt over fire generasjoner.

Det er også vist at de innsatte genene er stabilt inkorporert i maisgenomet ved dyrking i forskjellige lokaliteter over to år. Feltforsøkene er fra 3 forskjellige land, og over minst 2 år.

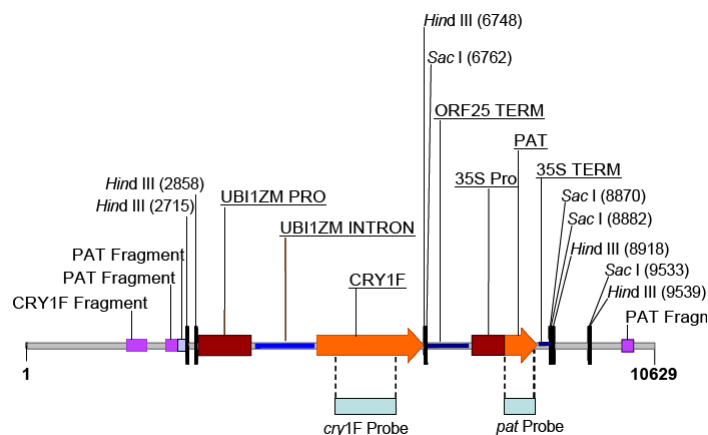
Faggruppen har tidligere vurdert karakteriseringen av det rekombinante innskuddet, de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av 59122 til å være tilstrekkelige.

Mais 1507 (foreldrelinje):

Den genmodifiserte maislinjen 1507 uttrykker glufosinat- og insektstoleranse ved at et lineært DNA fragment på 6235 basepar (1507 transkript) ved hjelp av partikkel akselerasjonsmetoden er ført inn i maisceller. Dette DNA fragmentet inneholder følgende gener og DNA elementer (figur 2):

- a) *pat* genet fra jordbakterien *Streptomyces viridochromogenes*. *Pat* genet uttrykker enzymet fosfinotricin acetyltransferase (PAT, phosphinothricin acetyl transferase) som har høy spesifisitet overfor fosfinotricin, som er den aktive komponenten i herbicider av glufosinat-typen. PAT inaktiverer fosfinotricin ved N-acetylering og beskytter derved planten i et fosfinotricinmiljø. Basesekvensene i genet er endret slik at genet kan uttrykkes i planter. PAT proteinets aminosyre-sekvens i planten er lik bakterieproteinets aminosyresekvens.
- b) CaMV 35S Promoteren og terminatoren CaMV 35S kommer fra agurk mosaikkvirus. Promoteren styrer uttrykket av *pat*. Termineringen av uttrykket styres av terminatoren CaMV 35S.
- c) *CryIF* genet kommer fra *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*) sbsp. *aizawai*, som er en vanlig jordbakterie. Bakterien danner det intracellulære proteinkrystallet CRYIF som har entomopatogen effekt. Basesekvensene i genet er endret slik at genet kan uttrykkes i planter. CRYIF proteinets aminosyresekvens i planten er lik bakterieproteinets aminosyresekvens.
- d) *ubiZM1(2)* Ekspressjonen av *CryIF* reguleres av promoteren *ubiZM1(2)* som kommer fra mais.

- e) *mas1* Termineringen av ekspresjonen styres av terminatoren *mas1* fra *Agrobacterium tumefaciens*.



Figur 2:

Restriksjonskart og beskrivelse av de forskjellige genelementene på det rekombinante DNA fragmentet som er satt inn i genomet til mais 1507.

Karakterisering av geninnsettingen

Southern blot - og sekvensanalyse viser at et nesten fullengde kopi av 1507 DNA fragmentet (6186 bp fra 6235 bp fragmentet) er satt inn i maisens genom. Et ca. 11 kb genomisk DNA fragment fra mais hvor 1507 fragmentet ligger på, er sekvensert. Dette DNA fragmentet inneholder begge genene og de respektive regulatoriske sekvensene til 1507 fragmentet. I tillegg inneholder dette fragmentet 6 ikke-funksjonelle DNA-fragmenter som stammer fra 6235 bp 1507 fragmentet. Disse 6 DNA fragmentene befinner seg enten ved 5' eller 3' endene til 6186 bp fragmentet.

Western blot og påvisning med polyklonale antistoffer viser at både Cry1F og PAT proteinene har den forventede molekylvekt. Cry1F forelå som dublett, henholdsvis med 65 og 68 kD. Årsaken oppgis å være at planteproteaser spalter av et N-terminalt fragment, siden trypsinbehandling av CRY1F proteinet gir et protein på 65 kD. Det er ingen indikasjoner på fusjonsproteiner. Cry1F ble påvist i blad, pollen, korn og hel plante. PAT ble kun påvist i blad.

Påvisning av åpne leserammer (ORF)

Det gjort en detaljert studie for å påvise åpne leserammer. Det er påvist 5 åpne leserammer, ORF1, ORF2, ORF3, ORF4 og ORF25PolyA. ORF25PolyA er deler av CaMV 35S promotor og terminator. ORF4 ligger inne i ORF25PolyA. ORF1 og 2 er deler av 1507 transkriptet, og de kommer fra maisgenomet. Disse to ORFene ble også påvist i umodifisert mais, men har ikke noen homologi til beskrevne sekvenser i maisgenomet. De har ikke regulatoriske elementer som kan føre til transkripsjon. ORF3 og ORF4 ligger henholdsvis på grensen av og inne i 1507 fragmentet. Det er ikke påvist ORF3 transkript ved Northern eller RT-PCR.

Northern og RT-PCR analyser for påvisning av ORF4 transkript indikerer at heller ikke denne åpne leserammen er i stand til å føre til transkripsjon selv om den ligger inne i ORF25PolyA.

Den genmodifiserte maisen er selvpollinert 2 ganger og tilbakekrysset fire ganger med den opprinnelige maisplanten, slik at GM-maisen er tilnærmet 100 % lik den opprinnelige maisplanten. Analyser viser at 1507 DNA fragmentet er stabilt inkorporert i maisgenomet i minst 6 generasjoner.

Det er vist at de innsatte genene er stabilt inkorporert i maisgenomet ved dyrking i forskjellige lokaliteter over to år. Feltforsøkene er fra 4 forskjellige land, og over minst 2 år.

Faggruppen har tidligere vurdert karakteriseringen av det rekombinante innskuddet, de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av 1507 til å være tilstrekkelige.

Hybriden 1507x59122

1507x59122 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom maisene 59122 og 1507.

Molekylær karakterisering:

Det er foretatt Southern blot-analyse for å undersøke tilstedeværelsen og antall kopier av 59122- og 1507-ekspresjonskassetene i 1507x59122. DNA som ble brukt til analysene er ekstrahert fra blad. Det er benyttet genprober som er spesifikke for de enkelte genelementene på de respektive rekombinante DNA innskuddene. Det er påvist én enkel kopi av henholdsvis 59122- og 1507-ekspresjonskassetene.

Pioneer hevder at analyser med Southern blot av de rekombinante DNA innskuddene i 1507x59122 genomet viser at det er molekylær ekvivalens og identisk kopiantall med de rekombinante DNA innskuddene i henholdsvis 59122 og 1507. Sekvensering av DNA oppstrøms og nedstrøms for innsetningsstedet i 1507x59122 er ikke utført fordi dette er utført i 59122 og 1507. Pioneer hevder at sammenlignende Southern blot-analyser mellom hybridene 1507x59122 og de to foreldrelinjene viser at bruttostørrelsen på de innsatte DNA-fragmentene er intakte. I henhold til Pioneer viser molekylær karakterisering med Southern blot at det ikke har skjedd ommøblering av genene på de rekombinante DNA innskuddene i 1507x59122. Pioneer hevder at det derfor ikke kan forventes ekspresjon av fusjonsproteiner fra disse elementene.

Analyser av viktige komponenter:

Det foretatt analyser av mengde PAT, Cry1F, Cry34Ab1 og Cry35AB1 i maiskorn. Analysene er foretatt på planter som har vært sprøytet med glufosinat og usprøytet planter. For analyser av viktige næringsstoffer er det benyttet maiskorn.

Dokumentasjon av ”vesentlig likhet”

Analyse av ernæringsmessige viktige komponenter ble foretatt av 1507x59122 og kontrollhybrid fra fem forskjellige forsøksfelt i USA i 2003. Hvert forsøksfelt bestod av en fullstendig randomisert blokkdesign som inneholder fire blokker. Hver blokk inneholdt testhybriden 1507x59122 og en kontroll. I blokkene i forsøksfeltene ble noen av testhybridene sprøytet 2 ganger med glufosinat, andre ble ikke sprøytet. Som kontroll er det benyttet en umodifisert kontrollhybrid som hevdes å ha samme genetisk bakgrunn som de genmodifiserte plantene.

Hovedkomponenter i maiskorn og andre plantedeler:

Valget av analyseparametre er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for mais, men det er ikke analysert for alle parametrene som er anbefalt i OECD dokumentet (OECD 2002). Det ble analysert for protein, fett, aske, karbohydrater, ADF (acid detergent fibre), NDF (neutral detergent fibre), total fiber, kalorier, aminosyrer, fettsyrer, fosfor, jern, kalium, kalsium, kobber, magnesium, mangan, natrium, sink, vitaminene beta-karoten, B1, B2, E, folinsyre, de sekundære metabolittene furfural, ferulsyre, inositol, raffinose og p-cumarinsyre, og anti-næringsstoffene fytinsyre og trypsinhemmer. Det er ikke analysert for vann, selen, niacin og vitamin B6. Analysene ble utført under god laboratoriepraksis (GLP). Det er foretatt analyser av planter som er behandlet eller ubehandlet med glufosinat. Det er tatt ut tre replikater fra hver lokalitet.

For hovedkomponenten aske er det funnet statistiske forskjeller i korn fra ubehandlet planter, men signifikante forskjeller ble funnet i et av de fem forsøksfelt. For glufosinbehandlet planter er det funnet statistiske forskjeller for total fiber og aske på tvers av forsøksfeltene. For total fiber er det ikke funnet statistiske forskjeller innenfor hver av de fem forsøksfeltene. Signifikante forskjeller for aske ble påvist for en av de fem forsøksfeltene. Analyser over hovedkomponenter i maisplanten viser at verdier for alle disse hovedkomponentene ligger innenfor typiske verdiområder for andre maissorter som er publisert.

Fettsyresammensetning i maiskorn:

Fettsyresammensetningen for 1507x59122 er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Det ble analysert for 5 fettsyrer, dvs. palmitin, stearin, olje, linol og linolen. Målingene utført på ubehandlet 1507x59122 viser statistiske forskjeller for palmitinsyre på tvers av forsøksfeltene, men kun mellom to forsøksfelt. For glufosinatbehandlet mais er det funnet statistiske forskjeller for palmitin- og oljesyre på tvers av forsøksfeltene. Det ble ikke påvist signifikante statistiske forskjeller i fire av de fem forsøksfeltene. Forskjellene er mindre enn 10 %, og verdiene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen.

Aminosyrer i maiskorn:

Analyser av aminosyrer er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument. Det er funnet statistiske forskjeller i middelværdi for aminosyrene tryptofan og fenylalanin på tvers av forsøksfeltene. Det ble ikke påvist statistiske forskjeller for tryptofan innenfor fire av de fem forsøksfeltene. Det ble påvist statistiske forskjeller for fenylalanin innenfor to forsøksfelt. For glufosinatbehandlet mais er det ikke funnet statistiske forskjeller på tvers av forsøksfeltene.

Verdiene for alle aminosyrene ligger verdiene innenfor de typiske verdiene som er rapportert i litteraturen.

Vitaminer:

Vitaminer som i henhold til OECDs konsensusdokument for mais bør undersøkes for er β -karoten, B1, B2, B6, E, folat og niacin. Følgende vitaminer er ikke målt vit. B6 og niacin. Mengde av vit. B2 er lavere enn påvisningsgrensen for alle forsøksfeltene. For vit. E og B1 er det ikke påvist statistiske forskjeller i middelvei på tvers av forsøksfeltene. For β -karoten og folat er det påvist statistiske forskjeller på tvers av forsøksfeltene. For β -karoten er det er ikke påvist statistiske forskjeller innenfor de enkelte forsøksfeltene, mens for folat ble det påvist signifikante forskjeller innenfor et av de fem forsøksfeltene. For glufosinatbehandlet mais er det ikke funnet statistiske forskjeller på tvers av forsøksfeltene. Verdiene ligger de typiske verdiene som er rapportert i litteraturen.

Mineraler:

Med unntak for selen er mineralene som er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Mais er en viktig selenkilde i dyrefôr (Watson 1987). For fosfor, jern og kalium er det påvist statistiske forskjeller i middelvei på tvers av forsøksfeltene i korn fra både ubehandlet og glufosinatbehandlet planter. Innenfor ett av forsøksfeltene er det påvist statistiske forskjeller for fosfor og jern for ubehandlet -, og for jern og kalium for glufosinatbehandlet planter. Innen for tre av de fem forsøksfeltene er det påvist statistiske forskjeller for kalium for ubehandlet og fosfor for behandlet planter. Forskjellen er imidlertid små og ligger innenfor 20 %, og ligger også innenfor for typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen.

Sekundære metabolitter og antiernæringskomponenter:

De sekundære metabolitter og antiernæringskomponenter som er målt er i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Det er funnet statistiske forskjeller i gjennomsnittlig middelvei for trypsinhemmer og raffinose for både ubehandlet og behandlet planter på tvers av forsøksfeltene. Det er funnet statistiske forskjeller i gjennomsnittlig middelvei for p-kumarsyre og ferulsyre for behandlet planter på tvers av forsøksfeltene. Det ble ikke påvist statistiske forskjeller for ferulsyre innenfor de enkelte forsøksfeltene. De påvist statistiske forskjeller for p-kumarsyre, raffinose og trypsinhemmer er innenfor ett (separate) av de fem forsøksfeltene. Forskjellen som er funnet ligger også innenfor for typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen.

Delkonklusjon:

Det er funnet statistiske forskjeller i enkeltparametre. Verdiene for de enkelte analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen.

Faggruppen anser at de forskjellene som er påvist, ikke har noen ernæringsmessig betydning.

Dokumentasjon av toksisitet og allegenisitet

Toksisitet:

Søknaden inneholder dokumentasjon på fôringsforsøk med renfremstilt PAT, Cry34Ab1, Cry35Ab1 og Cry1F.

Akutforsøk:

Pioneer henviser til akuttstudie på mus med PAT, Cry34Ab1, Cry35Ab1 og Cry1F protein. Studiene er utført i henhold til EUs (EEC 1992), EPAs (EPA 1998a) og OECDs (OECD 1987) retningslinjer for oral akuttoksisitetsstudier. De fire proteinene er fremstilt fra bakterier. Proteinene Cry34Ab1 (dose = 2700 mg/kg kroppsvekt) og Cry35Ab1 (dose = 1850 mg/kg kroppsvekt) er fôret enten hver for seg eller i blanding. I blanding er mengde Cry34Ab1 482 mg/kg kroppsvekt og Cry35Ab1 1520 mg/kg kroppsvekt. PAT dosen i forsøket er 5000 mg/kg kroppsvekt og Cry1F-dosen er 576 mg/kg kroppsvekt. Det er benyttet 5 mus i hver av studiene med Cry-proteinene, mens med Cry-proteinene i blanding er det benyttet 5 hann- og 5 hunnmus. For de andre proteinene er det henvist til studier som er dokumentert i andre EFSA søknader. Etter 14 dager er det ikke vist tegn på toksisk påvirkning i noen av forsøkene for alle proteinene. Dyrene ble avlivet og det er ikke påvist organskader ved grov patologisk undersøkelse.

Fôringsforsøk på rotter:

Det er ikke utført et 13 ukers fôringsforsøk på rotter med 1507x59122. Pioneer henviser til fôringsforsøk på rotter utført med fôr fra de enkelte maishybridene.

Fôringsforsøk på broiler:

Søknaden inneholder dokumentasjon fra 42-dagers fôringsforsøk på broilere, 480 dyr, fordelt i fire grupper à 120 dyr, 12 bur à 5 hunn + 5 hann, som ble fôret med henholdsvis mais fra 1507x59122, foreldrelinje (linje 091) og to kommersielle maissorter (33P66, 33J56). Gjennomsnittlig inntak av Cry34Ab1-, Cry35Ab1-, Cry1F- og PAT-protein er per dag henholdsvis 17,5; 1,2; 1,6; og < 0,1 µg/g fôr. Gjennomsnittlig inntak av fôr per dag er 82 g. I henhold til søker er det ikke påvist testrelaterte statistiske endringer i de parametrene som ble målt (se Annex 3).

Faggruppen konkluderer med at det på bakgrunn av disse forsøkene ikke er grunn til å anta at den ernæringsmessige kvaliteten til den genmodifiserte maisen er forskjellig fra umodifisert mais.

Allergenisitet:

PAT

Allergener er analysert i henhold til EFSA's retningslinjer og FAO/WHO's anbefalte prosedyre (FAO/WHO 2001). Sammenligning av et proteins aminosyresekvens med aminosyresekvensen til et kjent allergent protein regnes som en nyttig indikator på allergent potensiale. Aminosyresekvensen til de fleste viktige allergener, deriblant matallergener, er kjent. De

viktige IgE-bindingsepitopene, dvs. aminosyresekvenser på 5-7 aminosyrer der IgE binder seg, er kartlagt for mange allergener.

PAT-proteinet

Generelt er proteiner som er matallergener varme- og syrestabile, selv om det er en del unntak. De er stabile både overfor mage- og tarmsafter, samt at de ofte er hovedproteinikomponenter i matvaren. Typiske mengder er fra 1 til 80 % av proteininnholdet. Mengden av PAT-proteinet i maisen er fra $<0,1\mu\text{g/g}$ - $0,4\mu\text{g/g}$ tørrvekt korn. Pioneer henviser til tester i simulert mage- og tarmsaft som viser at proteinet brytes ned i løpet av kort tid, ca. 15 sekunder. Det antas derfor at proteinet også brytes raskt ned i menneskets mage- og tarmkanal.

Pioneer henviser til utførte søk for aminosyresekvenshomologi for PAT-proteinet til aminosyresekvenser i databaser som inneholder aminosyresekvenser til kjente allergener og toksiner. Det er ikke funnet homologi til slike proteiner.

Faggruppen konkluderer med at det usannsynlig at PAT-proteinet medfører et potensiale for utvikling matallergi hos mennesker.

Bt-proteiner

Til tross for vel 50 års bruk av B.t.k. som sprøytemiddel er det ingen bekreftede rapporter over øyeblikkelige eller forsinkede allergiske reaksjoner til tross for betydelig human eksponering via munn, hud og luftveier. Laboratoriestudier med pattedyr indikerer heller ingen potensielle allergiske reaksjoner mot *Bacillus thuringiensis* eller dens komponenter innbefattet delta-endotoksinet i krystallproteinet. Allergiske reaksjoner mot *Bacillus thuringiensis* har vært rapportert, men disse har ikke vært tilskrevet krystallproteinet.

Det har ikke vært utført immunologiske studier med de transgene produktene. Det er vist at Cry1Ac-proteinet binder seg til musetarmoverflaten og induserer immunologiske reaksjoner mot seg selv og mot proteiner gitt samtidig (Vazquez-Padron *et al.* 2000a, Vazquez *et al.* 1999, Moreno-Fierros *et al.* 2003, Rojas-Hernández *et al.* 2004). Immunologisk kartlegging av systemisk og mucosal immunreaksjon på Cry1Ac har videre påvist at mus lager både systemisk IgM, IgG og sekretorisk IgA etter intraperitoneal og intragastrisk immunisering (Vazques-Padron *et al.* 2000b). Det er ukjent om Cry1Ac-proteinet som er benyttet i disse studiene, tilsvarer Cry1F-toksinet som den transgene maislinjen lager. Det er vist at domene II fra Cry1Ab og Cry1Ac genererer ulik immunologisk respons i kanin (Vazquez-Padron *et al.* 1998). I en annen studie er det vist at Cry1Ac hadde utpreget mucosal adjuvanseffekt ved å potensere IgM-, IgG- og IgA-responsen mot hepatittvirusantigen og bovint serumalbumin som ble gitt med sondeføring samtidig med Cry1Ac (Vazquez *et al.* 1999). Produksjonen av IgE-antistoff, som er knyttet til allergisk reaksjon, ble ikke målt. Også i tidligere studier (Prasad & Shetna 1975) er det påvist adjuvanseffekt av krystallprotein fra *Bacillus thuringiensis*. Adjuvanseffekten av Cry1Ac er bekreftet i to senere publikasjoner med henholdsvis pneumokokk-antigen (Moreno-Fierros *et al.* 2003) og amøbe-lysate (Rojas-Hernández *et al.* 2004). Adjuvanseffekten av Cry1Ac ble funnet å være like sterk som adjuvanseffekten av koleratoksin (Vazques-Padron *et al.* 1999), som er et mye brukt slimhinneadjuvans i eksperimentelle studier av vaksinasjon og av allergi, og som regnes for å være det sterkeste slimhinneadjuvans vi kjenner.

Det gjennomsnittlige forbruket av mais i Europa i følge søker er $8,8\text{ g/person/dag}$, mens for eksempel i Afrika er forbruket $106,2\text{ g/person/dag}$ (GEMS/FOOD 2003). Spesielle

målgrupper, som barn, kan ha et langt større inntak av mais enn det beregnede gjennomsnittlige inntaket i Europa. I Frankrike er det rapporterte inntaket for store porsjoner, 97,5 persentil, for barn under 6 år 8,3 g/kg kroppsvekt/dag og for voksne 4,17 g/kg kroppsvekt/dag (FAO/WHO 2003). I henhold til Pioneer Hi-Bred er gjennomsnittlig mengde Cry34Ab1, Cry35Ab1 og Cry1F i maiskorn henholdsvis 40,8-, 1,6- og 1,9 µg/g tørrvekt korn. Teoretiske beregninger fra faggruppen viser at dersom alt maisinntak i Europa kommer fra 1507x59122 vil dette medføre et inntak for voksne på 380 µg Cry-protein/person/dag. Teoretiske beregninger fra faggruppen viser at for barn som spiser store porsjoner blir inntaket 350 µg Cry-protein/kg kroppsvekt/dag og for voksne 180 µg/kg kroppsvekt/dag. De totale mengdene for henholdsvis barn og voksne blir da 6200 µg/barn/dag og 10800 µg/person/dag. De mengder Cry1Ac som ga mucosal adjuvanseffekt ved sondeføring av mus var fra 0,1 µg til 100 µg (Vazquez *et al.* 1999). De adjuvansdoser som brukes for immunisering av mus og mennesker i andre sammenhenger er ofte av samme størrelsesorden, det vil si om lag samme dose brukes til mus og menneske. Det er mulig at Cry34Ab1, Cry35Ab1 og Cry1F som benyttes i 1507x59122 kan ha tilsvarende effekter som vist for det beslektede Cry1Ac-proteinet, som induserer immunologiske reaksjoner mot seg selv og økt reaksjon mot proteiner gitt samtidig. Dersom Cry34Ab1 og Cry35Ab1 har tilsvarende adjuvanseffekt som det beslektede Cry1Ac-proteinet er rapportert å ha, vil dette teoretisk kunne føre til økt utvikling av allergi mot matvarer spist sammen med maisen, foruten mot maisen selv. Matallergi mot mais er lite vanlig i Norge, men er et problem i noen områder, bl.a. Nord-Italia. Man ville vente at adjuvanseffekten kom til syne først og fremst som økt forekomst av allergi mot de matvarene der matallergi fra før er vanligst. IgE ble ikke målt i de refererte studiene av adjuvanseffekt av Cry1Ac-proteinet.

Uventede effekter av å sette inn nye gener kan opptre og kan føre til endret uttrykk av endogene proteiner. Det er imidlertid ikke påvist at slike effekter har skjedd med MON810 som inneholder Cry1Ab proteinet. MON810 har vært dyrket og konsumert siden 1996.

Konklusjon:

Finner Faggruppen det ut fra tilgjengelige data vanskelig å vurdere om korn fra 1507x59122 er mer allergifremkallende enn umodifisert maiskorn. På bakgrunn av foreliggende eksperimentelle studier i mus, finner Faggruppen at muligheten for økt allergifremkallende aktivitet til 1507x59122 med den informasjon vi har tilgang til, ikke med rimelig sikkerhet kan utelukke. Faggruppen mener at siden adjuvanseffekt av Cry34Ab, Cry35Ab1 og Cry1F ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes, må det kreves av Pioneer Hi-Bred å kommentere forsøkene som viser adjuvanseffekt av Cry1Ac i forhold til muligheten for adjuvanseffekt av Cry34Ab1, Cry35Ab1 og Cry1F.

KONKLUSJON

Det er funnet statistiske forskjeller i enkeltparametre, men verdiene for de enkelte analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen. Faggruppen anser at disse forskjellene ikke har noen helsemessig signifikans. Faggruppen konkluderer med at det på bakgrunn av den tilgjengelige informasjonen ikke er grunn til å anta at den ernæringsmessige kvaliteten til den genmodifiserte maisen 1507x59122 er forskjellig fra umodifisert mais.

Studier viser at proteinene Cry34Ab1, Cry35Ab1 og PAT ikke er akutt toksiske. Pioneer Hi-Bred har utført sub-kroniske studier på kyllinger med 1507x59122. Faggruppen konkluderer med at det er lite sannsynlig at eksponering for PAT-proteinet i seg selv og i de mengder som tilføres via genmodifisert mais, er helsemessig betenkelige.

Faggruppen mener at det må kreves av Pioneer Hi-Bred å kommentere de forsøk som gjort der det er påvist adjuvanseffekter av Cry1Ac og om slike effekter kan oppstå ved inntak av maisprodukter som inneholder de aktive Cry34Ab1 og Cry35Ab1-proteinene.

VURDERT AV

Faggruppe for genmodifiserte organismer:

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

Koordinator fra sekretariatet: Arne Mikalsen

REFERANSER

EEC 1992. EEC Methods Number B.1 Acute Toxicity (Oral).

EFSA 99, 2004. "Guidance document for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed".

EHC, 1999. Environmental Health Criteria 217. *Bacillus thuringiensis*. WHO, Geneva 1999

EPA 1998a. EPA Health Effects Test Guidelines; OPPTS 870.1100.

EPA 1998b. U.S. EPA Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.3100, 90-Day Oral Toxicity in Rodents (1998).

FAO/WHO 2003. Acute hazard exposure assessment for pesticide residues in food.

http://www.who.int/foodsafety/chem/acute_data/en/

GEMS/FOOD 2003. GEMS/Food regional diets: regional per capita consumption of raw and semi-processed agricultural commodities / prepared by the Global Environment Monitoring System/Food Contamination Monitoring and Assessment Programme (GEMS/Food). -- Rev. ed. FAO/WHO 2003, ISBN 92 4 159108 0

Moreno-Fierros L, Ruiz-Medina EJ, Esquivel R, López-Revilla R, Piña-Cruz S., 2003. Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides in mice. Scand J Immunol., 57: 45-55.

OECD 1987. OECD Guidelines No. 401 Acute Oral Toxicity

OECD 1998. OECD Guideline for the Testing of Chemicals Section 4: Health Effects, Number 408 (1998)

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.

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

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

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

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

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

Vazquez-Padron RI. Moreno-Fierros L. Neri-Bazan L. Martinez-Gil AF. de-la-Riva GA. Lopez-Revilla R., 2000b. Characterization of the mucosal and systemic immune response induced by Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice. *Braz J Med Biol Res.*, 33: 147-55.

Watson, S.A. (1987) Structure and Composition. In: *Corn. Chemistry and Technology*. S. A. Watson and P. E. Ranstead (eds). American Association of Cereal Chemists, Minnesota.