



Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet

9.05.08

Miljøriskovurdering av genmodifisert maishybrid 1507x59122 fra Pioneer Hi-Bred International, Inc. og Mycogen Seeds (EFSA/GMO/NL/2005/28)

SAMMENDRAG

Miljøriskovurderingen av den genmodifiserte herbicid- og insektresistente maislinjen 1507x59122 fra Pioneer Hi-Bred International, Inc. og Mycogen Seeds (EFSA/GMO/NL/2005/28) er utført av Faggruppe for genmodifiserte organismer under Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM). VKM er blitt bedt av Direktoratet for naturforvaltning (DN) om å vurdere miljørisiko ved en eventuell godkjenning av maislinje 1507x59122 for alle bruksområder, inkludert dyrking. Faggruppe for genmodifiserte organismer har tidligere vurdert helseaspekter knyttet til bruk av maislinjen som næringsmiddel og fôrvare (VKM 2007).

Vurderingen av den genmodifiserte maisen er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EUs nettside GMO EFSA-net. I tillegg er det benyttet informasjon fra uavhengige vitenskapelige publikasjoner i vurderingen. Maishybriden 1507x59122 er vurdert i henhold til tiltenkt bruk (dyrking, fôr og mat), og i overensstemmelse med kravene i genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven. Videre er kravene i EUs utsettingsdirektiv 2001/18/EF (vedlegg 2, 3 og 3B) og veiledende notat 2002/623/EF, nedfelt i EFSA's retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter lagt til grunn for vurderingen. Vurderingen omfatter transformasjonsprosess og vektorkonstruksjon, karakterisering, uttrykk og nedarving av genkonstruksjonen, agronomiske egenskaper, potensialet for ikke intenderte effekter på fitness, genoverføring og mulige effekter på ikke-målorganismer, abiotisk miljø og dyrkingspraksis.

F1-hybriden 1507x59122 er dannet ved konvensjonell kryssing av foreldrelinjene 1507 og 59122. Foreldrelinjen 1507 har fått innsatt et *cry1F*-gen fra bakterien *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* og et *pat*-gen, som er isolert fra *Streptomyces viridochromogenes*. *Cry1F*-genet koder for et δ -endotoksin og gir resistens mot enkelte arter i ordenen *Lepidoptera*, eksempelvis maispyralide (*Ostrinia nubilalis*) og nattflyarten *Sesamia nonagrioides*. *Pat*-genet koder for enzymet fosfinotricin acetyltransferase (PAT), som acetylerer og inaktiverer glufosinat-ammonium, virkestoffet i fosfinotricin-herbicer av typen Finale. Foreldrelinjen 59122 uttrykker en ny type *Bt*-toksin, som er resultat av introduksjon av to *cry*-gener (*cry34Ab1* og *cry35Ab1*) fra *B. thuringiensis* stamme PS149B1. Proteinene virker sammen som

et binært toksin og gir plantene resistens mot angrep fra arter i slekten *Diabrotica*. Produkter av 1507x59122 markedsføres under handelsnavnet Herculex® XTRA.

Med unntak av insekts- og herbicidtoleranse, viser feltforsøk i Europa små eller ingen signifikante forskjeller mellom maishybriden 1507x59122 og konvensjonelle linjer med hensyn på agronomiske karakterer. Det vurderes ikke å være økt risiko knyttet til spredning, etablering og invasjon av maislinjen i naturlige habitater, eller utvikling av ugraspopulasjoner av mais i dyrkingsmiljø sammenlignet med konvensjonelle sorter.

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

I Norge er det registrert enkeltfunn av målorganismen *O. nubilalis*, men arten er ikke rapportert som skadegjører. Det er ikke gjort observasjoner av arter i slektene *Sesamia* eller *Diabrotica* i Norge. Det er publisert svært få vitenskapelige undersøkelser som belyser mulige effekter av *Bt*-toksinene Cry1F og Cry34Ab1/Cry35Ab1 på ikke-målartropoder. Det er ikke publisert toksisitetsstudier av Cry1F relatert til *Lepidoptera*-arter som er utbredt i Europa, og det foreligger lite dokumentasjon på mulige effekter av Cry34Ab1/Cry35Ab-proteinene på ikke-målorganismer, spesielt fra arter i samme taksonomiske gruppe. Ved en eventuell dyrking av maishybriden 1507x59122 i Norge, vurderes risiko for ikke-målartropoder som lever på eller i nærheten av maisplanter til å være liten/ubetydelig. Arealene med mais i Norge er så små at det er lite sannsynlig at eventuell negative effekter av Cry1F- og Cry34/35Ab1-toksinene vil medføre noen trussel for disse organismene.

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

Basert på de oppgitte egenskaper til maishybriden 1507x59122, vedlagt dokumentasjon, samt informasjon i åpen litteratur vurderes risiko for negative effekter på jordlevende organismer til å være minimal. Ved anbefalt dyrkingspraksis med vekstskifte vil potensielle effekter på jordlevende organismer og jordmiljø trolig være ubetydelige. Det er kunnskapsmangler med hensyn på effekter av toksinet på vannlevende organismer. Konsentrasjonene av *Bt*-endotoksiner i akvatiske systemer er imidlertid vist å være svært lav, og eventuell eksponering på disse organismene vil være marginal.

Glufosinat-ammonium har helseklassifisering for både akutte og kroniske skadevirkninger, og er ikke tillatt brukt i mais verken i Norge eller EU. Miljørisiko knyttet til dyrking av 1507x59122 med bruk av dette herbicidet er derfor ikke vurdert for EØS-landene, inkludert Norge.

Samlet vurdering

Det er betydelige kunnskapsmangler relatert til effekter av *Bt*-toksinene Cry1F og Cry34Ab1/Cry35Ab1 på ikke-målgrupper av terrestriske og akvatiske organismer. I norsk sammenheng, og sett i forhold til annen mais, finner likevel Faggruppen at maishybriden 1507x59122 har en lav risiko for effekter på miljø.

NØKKEWORD

Genmodifisert mais, 1507x59122, EFSA/GMO/NL/2005/28, insektsresistens, herbicidtoleranse, PAT, *cry34Ab1*, *cry35Ab1*, *cry1F*, glufosinat-ammonium, miljø

INNHOLDSFORTEGNELSE

SAMMENDRAG	1
VURDERT AV	4
BAKGRUNN	5
OPPDRAK FRA DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING	4
MILJØRISIKOVURDERING	7
KONKLUSJONER	28
REFERANSER	29
VEDLEGG	36

Vurdert av:

Faggruppe for genmodifiserte organismer:

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

Koordinatorer i sekretariatet: Arne Mikalsen, Merethe Aasmo Finne

BAKGRUNN

Faggruppe for genmodifiserte organismer under Vitenskapskomiteen for mattrygghet er blitt bedt av Direktoratet for naturforvaltning om å foreta en vitenskapelig vurdering av miljørisiko ved en eventuell godkjenning av maislinje 1507x59122 fra Pioneer Hi-Bred International Inc. og Mycogen Seeds (EFSA/GMO/NL/2005/28). Maislinjen er søkt omsatt i EU/EØS-området under Forordning (EF) No. 1829/2003 om genmodifiserte næringsmidler og fôrvarer (artiklene 3(1) og 15(1)), og i overensstemmelse med direktiv 2001/18/EF, del C. Søknaden omfatter bruksområdene import, videreprosessering, næringsmidler, fôrvarer og dyrking, og ble fremmet og anbefalt av nederlandske myndigheter i desember 2005. Søknaden ble lagt ut på EFSA-nett 31. august 2007, med frist på 90 dager for innspill fra EU og EØS/EFTA-landene. Pioneer Hi-Bred/Mycogen Seeds har tidligere fremmet en søknad om godkjenning av 1507x59122 til bruk i næringsmidler og fôrvarer (EFSA/GMO/NL/2005/15). Begge foreldrelinjene er godkjente for import, prosessering, mat og fôr i EU/EØS-området (<http://www.gmo-compass.org/>). Det også fremmet søknader om godkjenning av 1507 og 59122 for dyrking.

Maishybriden er notifisert i Spania, Frankrike, Ungarn og Bulgaria under del B av direktiv 2001/18/EF vedrørende utsetting av GMO i miljøet, og har vært utprøvd i feltforsøk siden 2002 (<http://gmoinfo.jrc.it/>). 1507x59122 er godkjent for dyrking i Japan og er i tillegg godkjent for bruk i næringsmidler og fôrvarer i Korea og Mexico (tabell 1, vedlegg). Det foreligger søknader om godkjenning av hybridene for omsetning i USA og Sør-Afrika (Defra 2006). Oversikter over notifiseringer av foreldrelinjene er presentert i tabell 2 og 3 (vedlegg).

Faggruppe for genmodifiserte organismer har tidligere vurdert helseaspekter knyttet til bruk av maislinjen som næringsmiddel og fôrvarer (VKM 2007).

OPPDRAG FRA DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING

Direktoratet for naturforvaltning har i brev datert 23.4.2008 (ref. 2008/4367 ART-BI-BRH) gitt Vitenskapskomiteen for mattrygghet i oppdrag å foreta løpende miljørisikovurderinger av genmodifiserte næringsmidler og fôrvarer som faller inn under EUs forordning 1829/2003/EF, og på bakgrunn av vurderingene gi innspill til EFSA-nett.

Søknad EFSA/GMO/NL/2005/28, genmodifisert maishybrid 1507 x 59122, ble lagt ut på EFSA-nett 1. september 2007. Faggruppe for genmodifiserte organismer skal i tråd med oppdragsbrev utarbeide en miljørisikovurdering av maislinjen for alle bruksområder, inkludert dyrking. Vurderingen av 1507x59122 skal utføres i henhold til tiltenkt bruk og i overensstemmelse med kravene i genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift 16. desember 2005 nr. 1495 om konsekvensutredning. Videre skal kravene i EUs utsetningsdirektiv 2001/18/EF med annekser, herunder prinsippene for miljørisikovurdering i vedleggene II, III og IIIB og veiledende notat 2002/623/EF legges til grunn for vurderingen. Prinsippene er nedfelt i EFSA's retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter ("Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed") (EFSA 2006).

I henhold til oppdragsbrev fra DN skal VKM primært fokusere på miljørisiko i EØS-området, og på miljørisiko som er spesifikke for Norge. Ved risikovurdering av herbicidresistente planter skal VKM vurdere miljørisiko som følge av bruken av herbicidet, basert på de endringer i sprøytemiddelbruk som kan forventes hvis planten tas i bruk. Det skal tas utgangspunkt i den regulering av bruk av herbicidet som gjelder på det tidspunkt søknaden vurderes. Videre heter det at dersom det er sannsynlig at reguleringen av bruken av det aktuelle herbicidet vil bli endret (hvis for eksempel mye tyder på at et herbicid vil bli tillatt eller forbudt i nær framtid) drøftes også hvilke konsekvenser dette vil få mht miljørisiko knyttet til herbicidbruk.

DN ber VKM gi en samlet konklusjon om miljørisiko i tråd med kravene i forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven, vedlegg 2 C.

Produktet som ønskes vurdert:

Genmodifisert maislinje 1507x59122 fra Pioneer Hi-Bred International, Inc. og Mycogen Seeds (EFSA/GMO/NL/2005/28)

Unik kode: DAS-Ø1507-1xDAS-59122-7

Status i EU: Søknad under forordning 1829/2003/EF. Frist for innspill til EFSA-nett 1. desember 2007.

MILJØRISIKOVURDERING

1. Innledning

Miljøriskovurderingen av den transgene maishybriden 1507x59122 er i hovedsak basert på dokumentasjon fra EFSA som er relatert til søknadene om godkjenning av hybridene (EFSA/GMO/NL/2005/28; EFSA/GMO/NL/2005/23) og foreldrelinjen 59122 (EFSA/GMO/NL/2005/12; EFSA/GMO/NL/2005/23). Denne informasjonen er tilgjengelig på EFSA's nettside GMO EFSA.net. I tillegg er det benyttet uavhengige vitenskapelige publikasjoner med referee i vurderingen.

Faggruppe for genmodifiserte organismer har ikke mandat til å risikovurdere plantevernmidler. I tråd med sitt mandat har faggruppen ikke vurdert miljørisiko knyttet til bruk av sprøytemidler av typen glufosinat-ammonium. I VKM blir risikovurderinger av plantevernmidler ivaretatt av Faggruppen for plantevernmidler.

1.1. Beskrivelse av egenskap(er) og virkningsmekanismer

F1-hybriden 1507x59122 er dannet ved tradisjonell kryssingsforedling mellom avkom av de genmodifiserte maislinjene 1507 og 59122.

Foreldrelinjen 1507 har fått innsatt et *cryIF*-gen fra *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* og et *pat*-gen, som er isolert fra jordbakterien *Streptomyces viridochromogenes*. *CryIF*-genet koder for et δ -endotoksin og gir resistens mot enkelte arter i ordenen *Lepidoptera*, eksempelvis maispyralide (*Ostrinia nubilalis*) og nattflyarten *Sesamia nonagrioides*. *Pat*-genet koder for enzymet fosfinotricin acetyltransferase (PAT), som acetylerer og inaktiverer glufosinat-ammonium, virkestoffet i fosfinotricin-herbicer (Finale mfl.). Herbicer, som er basert på glufosinat-ammonium, gir en irreversibel hemming av plantenes eget enzym glutaminsyntetase. Enzymet deltar i assimilasjonen av nitrogen og katalyserer omdanning av glutamat og ammonium til aminosyren glutamin. Ved sprøyting med fosfinotricin-herbicer vil inkorporeringen av nitrogen i planten blokkeres, og planten vil normalt dø etter kort tid på grunn av akkumulering av ammonium til et nivå som er toksisk for plantene. Når det introduserte *pat*-genet uttrykkes i de transgene maisplantene vil det aktive stoffet acetyleres og plantenes eget enzym glutaminsyntetase vil ikke hemmes. Syntesen av glutamat og detoksifiseringen av ammonium går derfor som normalt, og de transgene plantene vil derfor tolerere høyere doser av glufosinat sammenlignet med konkurrerende ugras.

Foreldrelinjen 59122 uttrykker en ny type *Bt*-toksin, som er resultat av introduksjon av to *cry*-gener (*cry34Ab1* og *cry35Ab1*) fra *B. thuringiensis* stamme PS149B1. Proteinene virker sammen som et binært toksin og gir plantene resistens mot angrep fra arter i slekten *Diabrotica* som *D. virgifera virgifera* ('Western Corn Rootworm'), *D. barberi* ('Northern Corn Rootworm') og *D. undecimpunctata howardi* ('Southern Corn Rootworm'). *Cry34Ab1*-proteinet er den aktive komponenten, men for å oppnå maksimal beskyttelse er det nødvendig med tilstedeværelse av begge proteinene. En antar at *Cry34Ab1* bindes til spesifikke reseptorer på overflaten/membranen til insektets tarmceller, mens *Cry35Ab1* virker ved å danne porer i cellemembranene (de Maagd 2003). Det rekombinante DNA-fragmentet inneholder også et *pat*-gen, som i følge søker primært er benyttet som markør ved seleksjon av transformerte planter.

2. Molekylær karakterisering

2.1. Hybridproduksjon

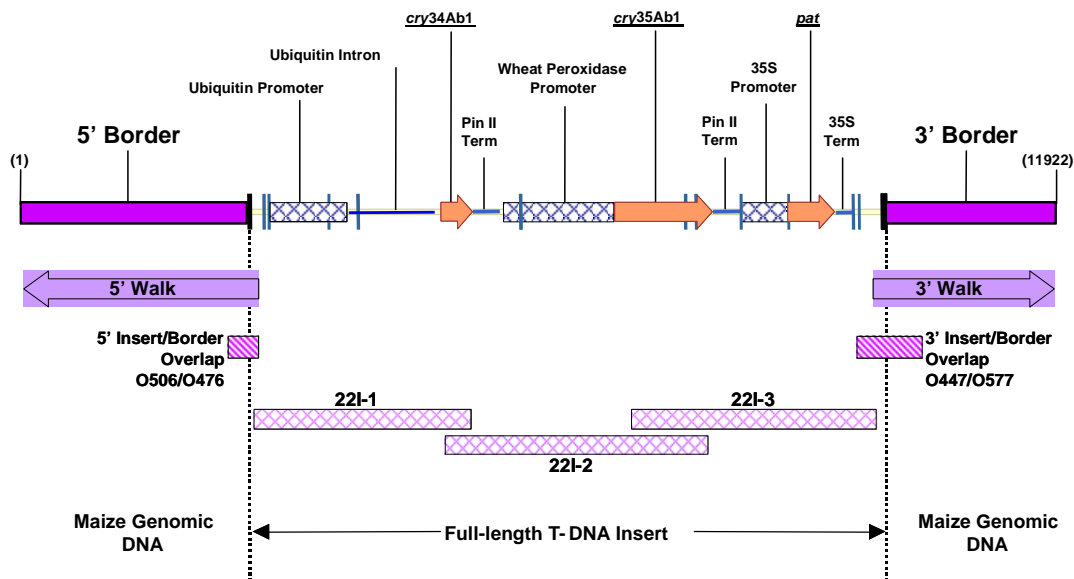
Hybridforedling er den dominerende foredlingsstrategien i konvensjonell foredling og sortsutvikling i mais i dag. Metodikken innebærer utvikling av innavlede, tilnærmet homozygote foreldrelinjer, som så krysses for produksjon av F₁-hybridfrø. Dette gir ensartede og produktive sorter (heterosiseffekt). Den transgene hybriden 1507x59122 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom maislinjene 59122 og 1507.

2.2. Evaluering av foreldrelinjer

2.2.1. Maislinje 59122

Den genmodifiserte maislinjen 59122 uttrykker glufosinat- og insekttoleranse ved at et lineært DNA fragment på 7390 basepar fra den binære vektoren PHP17662, ble overført til umodne maisceller 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) *cry35Ab1* 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 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 aminosyresekvens i planten er lik bakterieproteinets aminosyresekvens.
- h) CaMV 35S Promoteren CaMV 35S og terminatoren CaMV 35S kommer fra blomkålmosaikk-virus. Promoteren styrer uttrykket av *pat*. Termineringen av uttrykket styres av 35S Term.



Figur1. T-DNA rekombinant fragmentet fra det binære PHP17662 plasmidet med genomiske flankesekvenser.

Figuren viser et genomisk DNA fragment på 11922 bp hvor T-DNA rekombinant fragmentet 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/genkonstruksjonen

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.

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

Analysen av uttrykk av proteinene Cry34Ab1, Cry35Ab1 og PAT ble foretatt vha ELISA. Det ble tatt prøver av plantemateriale fra 11 ulike forsøksfelt i Chile, USA og Canada i 2002/2003, og 3 og 6 forsøk i Europa i 2003 og 2004. Prøvene ble tatt på fire ulike utviklingsstadier. Cry34Ab1-, Cry35Ab1-proteinene ble påvist i blad, pollen, korn, rot, stilk og hel plante, mens PAT proteinet bare ble påvist i blad, rot, stilk og hel plante. Nivået av PAT-protein i korn og pollen var under deteksjonsgrensen.

Uttrykket av Cry34Ab1- og Cry35Ab1-proteiner varierte mellom ulike organer/vev i planten, og mellom forsøksfelt. I pollen var konsentrasjonen av Cry35Ab1 lav eller under deteksjonsgrensen, mens nivået av Cry34Ab1 varierte mellom 50 og 74 µg/g tørrvekt. I Europa ble uttrykket av Cry34Ab1 og Cry35Ab1 i korn målt til henholdsvis 61,8 ± 16,5 og 2,34 ± 0,475 µg/g tørrvekt. Prøver fra feltforsøk i Chile og USA/Canada viste henholdsvis 36,4 ± 8,9 og 2,0 ± 0,7 µg/g tørrvekt. Variasjonen mellom prøver fra forsøksruter med og uten herbicidbehandling viste seg å være mindre enn variasjonen mellom forsøksfelt. Uttrykket av PAT-protein var generelt lavt i alle organer/vev der proteinet kunne påvises. Resultater fra prøver av hele planter viste konsentrasjoner på 0,0807 ± 0,0800 µg/g tørrvekt i de europeiske feltforsøkene.

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-blot, med 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. Det er gjort studier for å påvise kodende sekvenser hos maislinjen 59122. Det ble ikke påvist åpne leserammer som kan føre til uttrykk av peptider som er større enn 100 aminosyrer.

Nedarving og stabilitet av genkonstruksjonen/innsatt DNA

Genetisk stabilitet av den innsatte genkonstruksjonen er vist ved spaltingsdata og Southern analyse fra fire ulike generasjoner (T1S1, T1S2, BC1 og BC2S1). Utgangslinjen Hi-II med eventen 59122 (T0) ble krysset med en innavlet, elitelinje PH098B for å danne F1- generasjonen. F1-plantene ble selvbestøvet for å produsere T1S- og T1S2- generasjonene. For å danne BC1-hybriden ble F1-plantene krysset og tilbakekrysset med en innavlet linje 05F, og til slutt krysset med nok en innavlet linje 581. BC2S1-generasjonen ble dannet ved at F1-planter ble krysset og tilbakekrysset to ganger med innavlet linje 581, og videre selvbestøvet. Analyser av avkom fra den spaltende BC2S1-generasjonen viste forventet mendelsk nedarving av herbicidtoleranse og uttrykk av Cry34Ab1. Analyser av uttrykk av Cry34/35Ab1 og PAT fra feltforsøk over 2 vekstsesonger i Europa og Nord- og Sør-Amerika indikerer fenotypisk stabilitet.

Konklusjon

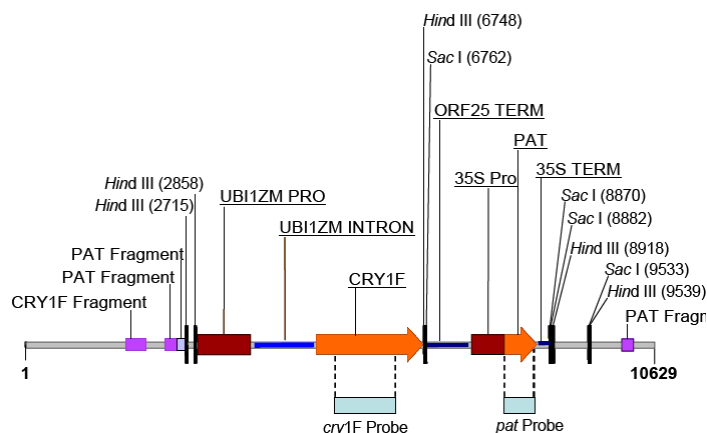
Faggruppen har tidligere vurdert karakteriseringen av det rekombinante innskuddet, de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av 59122 til å være tilstrekkelige (VKM 2005b).

2.2.2. Maislinje 1507

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

- a) *pat* gen fra jordbakterien *Streptomyces viridochromogenes*. *Pat* genet uttrykker enzymet fosfotricin acetyltransferase (PAT, fosfotricin 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 fosfotricinmiljø. Basesekvensene i genet er endret slik at genet kan uttrykkes i planter. PAT-proteinets aminosyresekvens i planten er lik bakterieproteinets aminosyresekvens.
- b) CaMV 35S Promoter og terminatoren CaMV 35S kommer fra agurk mosaikkvirus. Promoterer 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 promoterer *ubiZM1(2)* som kommer fra mais.

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



Figur 1. Restriksjonskart og beskrivelse av de forskjellige genelementene på det rekombinante DNA fragmentet som er satt inn i genomet til mais 1507.

Karakterisering av geninnsettingen/genkonstruksjonen

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.

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

Analyser av uttrykk av Cry1F- og PAT-proteiner ble foretatt vha ELISA. Cry1F ble påvist i blad, pollen, 'silke', stilk, frø og hel plante, men uttrykket av proteinet varierte mellom ulike utviklingsstadier og organer/vev i planten. I pollen ble den gjennomsnittlige konsentrasjonen målt til 20,0 µg/g tørrvekt (maksimum 29,3 µg/g tørrvekt), mens nivået i frø og prøver av hele planten varierte mellom hhv 1,2-3,1 og 1,0-6,6 µg/g tørrvekt. Nivået av Cry1F viste seg å være uavhengig av dyrkingsbetingelser og herbicidbehandling. Med unntak av blad og ekstrakter fra hel plante, var nivået av PAT-protein under deteksjonsgrensen.

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.

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 promoter 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.

Nedarving og stabilitet av genkonstruksjonen/innsatt DNA

Utgangslinjen Hi-II med eventen 1507 ble krysset med en av Pioneers elitelinjer, og tilbakekrysset over 6 generasjoner. Genetisk stabilitet av den innsatte genkonstruksjonen er vist ved spaltingsdata og Southern analyse. Feltforsøk i Europa og USA over flere vekstsesonger har også vist at de innsatte genene er stabilt inkorporert i maisgenomet.

Konklusjon

Faggruppen har tidligere vurdert karakteriseringen av det rekombinante innskuddet, de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av 1507 til å være tilstrekkelige (VKM 2004).

2.2.3. Hybriden 1507x59122

1507x59122 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom maislinjene 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.

Informasjon om uttrykk av introduserte gener

Søker opplyser om at nivået av uttrykk av Cry1F-, Cry34Ab1-, Cry35Ab1- og PAT-proteiner ble målt i feltforsøk i 2004. Forsøkene ble lagt ut på 5 ulike lokaliteter i Spania, Ungarn og Bulgaria i form av fullstendig randomiserte blokkdesign. Halvparten av blokkene ble behandlet med glufosinat-ammonium, og en ikke-transgen nær-isogen maislinje ble brukt som kontroll. Det ble foretatt analyser (ELISA) av hele planter, samt prøver av blad, røtter, pollen, stilk og maiskorn av kontrollinjen og henholdsvis behandlede og ubehandlede transgene planter. Prøvene ble tatt på 5 ulike utviklingsstadier. Nivåene av Cry1F-, Cry34Ab1-, Cry35Ab1- og PAT-proteiner i vegetativt vev og frø viste seg å være sammenlignbare, uavhengig av herbicidbehandling. Med unntak av PAT-protein i pollen, ble samtlige proteiner detektert i alle undersøkte vev og organer. I følge søker varierte uttrykk av Cry1F-protein i maiskorn hos 1507x59122 mellom 1,02 og 3,48 µg/g tørrvekt, og var i overensstemmelse med nivået i foreldrelinjen 1507. Nivået av Cry1F i pollen ble målt til i gjennomsnitt 26,8 µg/g tørrvekt. Det vises også til at målte proteinprodukter av Cry34Ab1 og Cry35Ab1 i vegetativt vev og frø var sammenlignbare med nivået i maislinjen 59122 (variasjonsområde Cry34Ab1: 75,1-127 µg/g TV, 20,4-120 µg/g TV; Cry35Ab1: 30,5-58,0 µg/g TV, 0,29-1,50 µg/g TV). Konsentrasjonen av PAT-proteiner i vegetativt vev ble målt til 1,87-6,15 µg/g TV, mens nivået i frø var 0,00 -0,210 µg/g TV.

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

Søker viser til spaltingsdata fra kryssinger over flere generasjoner med foreldrelinjene 1507 og 59122, og resultater fra en kryssningsgenerasjon med hybridene 1507x59122 for å demonstrere genetisk stabilitet. Videre viser Southern analyser av de rekombinante DNA innskuddene i 1507x59122 genomet at det er molekylær ekvivalens og identisk kopiantall med de rekombinante DNA innskuddene i henholdsvis 59122 og 1507.

2.2.4. Konklusjon

Hybriden 1507x59122 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom maislinjene 59122 og 1507. Spaltingsdata og Southern-analyser indikerer at de innsatte strukturer nedarves stabilt, og at antall, struktur og organisering av disse genkonstruksjonene er ekvivalent med de som finnes i foreldrelinjene. Nivåene av Cry1F-, Cry34Ab1-, Cry35Ab1- og PAT- proteiner i vegetativt vev og frø er sammenlignbare med uttrykk av tilsvarende proteinprodukter i foreldrelinjene.

3. Maisdyrking i Norge

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

I en undersøkelse av potensialet for og risiko for avlingssvikt ved dyrking av fôrmais i marginale områder, har Bakken et al. (2005) testet et utvalg tidlige sorter på ulike lokaliteter i Sør- og Midt-Norge. Konklusjonen på undersøkelsen er at med dagens sortsmateriale er fôrmaisproduksjon i Trøndelag og Rogaland et risikoforetak, også dersom en tar i bruk intensive dyrkingsmetoder. Ut fra resultatene i undersøkelsen vil ikke gode avlinger av tilstrekkelig kvalitet være årssikker selv i de beste jordbruksområdene langs Oslofjorden. Klimaendringer, som medfører lengre vekstsesong og høyere gjennomsnittstemperaturer, kan imidlertid utvide dyrkingsarealet for mais i Norge.

4. Glufosinat-ammonium

Glufosinat-ammonium (GA) er et bredspektret, kontaktvirkende bladherbicid, med virkning både på en- og tofrøbladete ugras. EFSA gjennomførte i 2005 en ny risikovurdering av glufosinat-ammonium (EFSA 2005), og ny godkjenning og bruksområde for virkestoffet ble fastsatt i et nytt direktiv (direktiv 2007/25/EF), med ikrafttredelse 1. oktober 2007. Endringene i EUs sprøytemiddeldirektiv (direktiv 91/414/EEC) medfører betydelige bruksbegrensinger for GA, og herbicidet er kun tillatt anvendt i epleplantasjer (skjermet sprøyting). Glufosinat-ammonium er lite giftig for fugler, bier, meitemark og andre jordorganismer, og EFSA konkluderer med at risikoen er lav for disse organismene (EFSA 2005). Stoffet er vist å være giftig for pattedyr, men EFSA vil ikke konkludere hvilken risiko dette innebærer for ville pattedyr før nyere data er gjennomgått. Glufosinat-ammonium har, til forskjell fra dagens godkjente midler i mais, helseklassifisering for både akutte og kroniske skadevirkninger (fareklasse T – giftig). Virkestoffet klassifiseres som farlig ved innånding, hudkontakt og svelging, og kan gi alvorlig helsefare ved lengre tids eksponering ved innånding og svelging. I tillegg er det rapportert at stoffet kan skade forplantingsevnen og ansees som en mulig risikofaktor for fosterskade. I følge EFSA vil bruk av glufosinat-ammonium i transgen mais føre til eksponeringer som overstiger akseptabel eksponeringsgrense (AOEL) for sprøytemannskap, også ved bruk av verneutstyr. Ved vurdering av søknader om godkjenning av preparater som inneholder virkestoffet glufosinat-ammonium i andre bruksområder enn frukthager, skal medlemslandene ta særlig hensyn til en rekke kriterier definert i Art. 4 (1)(b) i direktivet.

GA er per i dag godkjent som plantevernmiddel i Norge i preparatet Finale. Middelet er blant annet tillatt brukt mot ugras under frukttrær, bærbusker, prydbusker, i jordbær, poteter, grønnsaker, stauder og sommerblomster, i frøeng og til brakking (<http://www.plantevernguiden.no>). Herbicidet er ikke godkjent til bruk verken i fôr- eller sukkermais i Norge. Godkjenningen av det glufosinat-ammonium ble imidlertid trukket tilbake av Mattilsynet 18.1.2008 (A. Kraggerud, MT, pers.kom.), men er etter gjeldende avviklingsregler tillatt å bruke ut 2010.

Da glufosinat-ammonium per i dag ikke er godkjent for bruk i mais, verken i Norge eller EU, er miljørisiko knyttet til dyrking av 1507x59122 med bruk av dette herbicidet vurdert i henhold til oppdrag fra DN.

5. Agronomiske egenskaper

Søker opplyser at det er gjennomført feltforsøk med maislinjen 1507x59122 på 5 ulike lokaliteter i Spania, Ungarn og Bulgaria i 2004. Hvert forsøksfelt bestod av et fullstendig randomisert blokkdesign med 4 blokker. Halvparten av plotene med den transgene linjen ble behandlet med herbicidet glufosinat-ammonium, og en ikke-transgen nær-isogen maislinje ble benyttet som kontroll. Det er foretatt registreringer av karakterer knyttet til reproduksjon, spredning, vegetativ vekst, samt sjukdoms- og insektsresistens. Resultatene av statistiske analyser over steder viser signifikante forskjeller mellom kontrollinjen og 1507x59122 med hensyn på plantehøyde og tidlighet målt som tidspunkt for dannelselse av silkeaktige tråder ('silking') ($p < 0,05$). Søker konkluderer imidlertid med at disse forskjellene er uten agronomisk betydning. For de øvrige agronomiske og morfologiske egenskapene ble det ikke funnet signifikante forskjeller.

6. Potensiale for ikke intenderte effekter på fitness relatert til genmodifiseringen

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

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

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

Med unntak av toleranse overfor glufosinat-ammonium er det ikke påvist signifikante forskjeller mellom maislinjen 1507x59122 og konvensjonelle sorter med tilsvarende genetisk bakgrunn med hensyn på karakterer knyttet til reproduksjon og vegetativ vekst i feltforsøk i USA og Europa. Herbicidresistens kan bare betraktes å ha selektive fordeler hvor og når glufosatholdige herbicider anvendes, dvs. hovedsakelig på dyrket mark. Spredning av mais til andre habitater i Europa er hovedsakelig begrenset av dårlig konkurransevne, manglende frøkvile, mottagelighet for sjukdom og

liten toleranse for lave temperaturer. Siden det ikke er påvist forskjeller mellom den transgene maislinjen og konvensjonelle sorter for disse karakterene er det ikke grunn til å anta at den introduserte egenskapen hos 1507x59122 og avkomstlinjer medfører økt risiko for utvikling av ugraspopulasjoner av mais i dyrkingsmiljø eller invasjon av naturlige habitater i forhold til konvensjonelle maissorter.

7. Potensiale for genoverføring

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

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

7.1. Horisontal genoverføring

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

Ut fra dagens vitenskapelig innsikt mht barrierer for genoverføring mellom ubeslektede arter og flere års forskning for om mulig å framprovosere tilfeldig overføring av genetisk materiale fra planter til mikroorganismer, dyr eller mennesker gjennom inntak eller eksponering, er det ingenting som tyder på at transgenene i 1507x59122 skal kunne overføres til andre enn naturens kryssingspartnere dvs. annen dyrket mais i Europa. Det er blant annet gjort forsøk som ser på stabilitet og opptak av DNA fra tarmkanalen hvor mus er oralt tilført M13 DNA. Det tilførte DNAet var sporbart i avføring opp til syv timer etter fôring. Svært små mengder av M13 DNA (<0.1 %) kunne spores i blodbanene i en periode på maksimum 24 timer, mens M13 DNA ble funnet i opptil 24 timer i lever og milt (Schubert et al. 1994). Ved oralt inntak av genmodifisert soya er det vist at DNA er mer stabilt i tarmen hos personer med utlagt tarm sammenlignet med kontrollgruppen (Netherwood et al. (2004). I kontrollgruppen ble det ikke påvist GM DNA i feces. Nielsen et al. (2000) og De Vries og Wackernagel (2002) har undersøkt persistens av DNA og opptak av GM DNA i jord. I disse laboratorieforsøkene ble det detektert svært små mengder DNA som var overført fra planter til bakterier. Forutsetningen for at dette kunne skje var sekvenshomologi mellom plantetransgenet og mottagerbakterien.

Med bakgrunn i opprinnelse og karakter/egenskaper av de innsatte genene og mangel på seleksjonspress i fordøyelseskanal og/eller miljøet, er sannsynligheten for at horisontal genoverføring vil gi selektive fordeler eller økt fitness på mikroorganismer svært liten (Nielsen 2003). Det er derfor usannsynlig at gener fra 1507x59122 vil etableres stabilt i genomet til mikroorganismer i miljøet eller i fordøyelseskanalen hos mennesker eller dyr. Ut fra tilgjengelig kunnskap er det ikke grunn til å forvente at det vil skje horisontal genoverføring av DNA-materiale fra 1507x59122.

7.2. Vertikal genoverføring

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

Omfanget av utkryssing mellom sorter vil avhenge av en rekke parametere som avstand, topografi og vegetasjon mellom donor- og mottakerpopulasjonene, i tillegg til relativ størrelse, utforming og orientering av dyrkingsfeltene. Størrelsen på henholdsvis donor- og mottakerfeltet vil ha betydning for mengde konkurrerende pollen og dermed faktisk utkryssing (Ingram 2000; Devos et al. 2005). Tilsvarende vil en buffersone med samme landbruksvekst produsere konkurrerende pollen, i tillegg til å være en fysisk hindring for vindspredt pollen mellom feltene, og redusere innkryssingsrater effektivt. Graden av utkryssing vil også avhenge av hvordan resipientfeltet er utformet. Forsøk har vist at avlange og grunne dyrkingsfelt gir betydelig høyere utkryssingsfrekvenser sammenlignet med smale og dype felt med samme areal.

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

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

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

I en nylig publisert studie har Sanvido et al. (2007) vurdert en rekke undersøkelser av utkryssing i mais, og foreslått relevante kriterier for evaluering av slike studier med hensyn på definere vitenskapelig baserte isolasjonsavstander. Kriteriene for evaluering omfatter både biologiske og fysiske parametere, samt relevante dyrkingsbetingelser. Med utgangspunkt i EUs gjeldende

terskelverdi for utilsiktet og teknisk uunngåelig innblanding på 0,9 % i mat og fôr, har gruppen foreslått isolasjonsavstander på 20 og 50 m for henholdsvis fôr- og sukkermais.

I utkast til norsk regelverk for sameksistens er det foreslått et krav om minimum 200 meter avstandsisolering mellom dyrkingsareal med henholdsvis transgen og konvensjonell/økologisk mais. Faggruppe for genmodifiserte organismer har tidligere uttalt at foreslått dyrkingsavstand på 200 meter gir en tilstrekkelig sikkerhetsmargin, og anser at det er svært liten sannsynlighet for at den prosentvise innblandingen av transgener vil overstige 1 % med dette tiltaket (VKM 2006). Generelt anser faggruppen at det under slike forutsetninger er mer sannsynlig at den prosentvise innblandingen vil være under 0,3 % enn i intervallet 0,3 til 1,0 %. Det understrekes imidlertid at dette avhenger av forhold som dyrkingsfeltenes relative størrelse og utforming, samt eventuelle buffersoner.

Feltforsøk viser ingen indikasjoner på at karakterer knyttet til overlevelse, reproduksjon og spredning er endret hos 1507x59122 i forhold til ikke-transgene linjer. Pollenproduksjon og pollenets levedyktighet forventes ikke å påvirkes av genmodifikasjonen. Det er derfor ikke sannsynlig at utkryssingsfrekvensene til andre sorter vil være forskjellig fra konvensjonelle sorter.

Insekt- og herbicidtoleranse vil ikke representere noen selektiv fordel for spredning av mais i Europa. Overlevelse hos mais er hovedsaklig begrenset av manglende frøkvile, mottakelighet for soppjukdommer og liten frosttoleranse. Som for konvensjonelle sorter er det ingenting som tilsier at eventuelle spillplanter vil overleve til neste vekstsesong eller etablere uønskede populasjoner under våre dyrkingsforhold.

8. Samspill mellom GMP og målorganismer

I Norge er det rapportert om 8 funn av europeisk maispyralide (*Ostrinia nubilalis*). Alle påvisningene er gjort i fylkene Vestfold, Telemark, Aust-Agder og Vest-Agder (<http://nhm.uio.no/norlep/>). Det er ikke rapportert om funn av arter i slekten *Sesamia* (nattflyfamilien, *Noctuidae*) her i landet. Enkelte arter av bladlus er kjent som skadedyr på mais i Norge (Meadow 2007). Stort jordfly (*Agrostis ipsilon*) opptrer av og til som skadedyr i rotvekster, og det er mulig at arten også kan gjøre skade i mais.

Diabrotica virgifera virgifera ('Western corn rootworm') er det eneste målinsektet for foreldrelinje 59122 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 der det ikke praktiseres vekstskifte er spesielt utsatte.

Resistensutvikling

Utvikling av resistens hos insekter overfor *Bt*-toksin er en viktig problemstilling, med både agronomiske og miljømessige implikasjoner. Konvensjonelle *Bt*-produkter, i form av insekticider som sprøytes på plantene, har kort virketid (dager), og behandlingen vil ikke være effektiv overfor alle individene av målorganismene. Til tross for dette har noen arter utviklet resistens etter intensiv bruk av *Bt*-spray. Den første dokumentasjonen på resistens mot *Bt* som sprøytet insekticid ble gjort i populasjoner av kålmøll (*Plutella xylostella*) på Hawaii (Tabashnik et al. 1990). I følge OECDs nylig publiserte konsensusdokument vedrørende *Bt*-planter (OECD 2007) er det ikke påvist utvikling av resistens hos målorganismene *O. nubilalis* eller *Sesamia nonagroides* i felt i Europa. Laboratorieforsøk i USA har imidlertid påvist resistensutvikling hos *O. nubilalis* ved eksponering for Dipel®, et insekticid som inneholder *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Li et al. 2005). Larver fra Dipel®-resistente populasjoner som ble føret med Cry1A(b)-proteiner, utviklet også resistens mot

dietten (Li et al. 2005). En nylig publisert studie av overvåkingsdata fra dyrkingsfelt med *Bt*-sorter av bomull (Cry1Ac) i USA, dokumenterer imidlertid at frekvensen av resistensalleler har økt betydelig i populasjoner av *Helicoverpa zea* (Tabashnik et al. 2008). I samme undersøkelse ble det ikke påvist resistensutvikling i feltpopulasjoner av skadegjørerne *O. nubilalis* eller *S. nonagroides*.

Når det gjelder *Bt*-mais vil herbivorer innta toksinet hver gang de konsumerer plantevev, noe som åpenbart har implikasjoner med hensyn på resistensutvikling. Det har vært stor oppmerksomhet med hensyn på tiltak for å hindre rask utvikling av resistens. Vanlig praksis i dag er å sette av refugearealer med ikke-transgen mais i tilknytning til arealene med *Bt*-mais. Dette for å sørge for et habitat der herbivorene ikke eksponeres for toksinet, og kan utvikle populasjoner som ikke nedarver resistensgener. Det anbefales en strategi der 5 % av maisarealene består av usprøytet, ikke-transgen mais som enten plantes i nærheten av arealene med *Bt*-mais, eller inkorporeres i åkrer med transgen mais. Alternativt anbefales et dyrkingsregime der 80 % av arealene består av *Bt*-mais og resterende 20 % med refugearealer med konvensjonell mais som behandles med ikke-*Bt*-insekticider (Shelton et al. 2002). Metodene med dyrking av konvensjonell mais i tilgrensende refuger har vist seg å være mest effektiv til å motvirke resistensutvikling. Undersøkelsen til Tabashnik et al. (2008) viser at refugearealer ikke hindrer resistensutvikling, men at prosessen tar lengre tid.

I tillegg til utvikling av resistens hos målorganismene, kan polyfage herbivorer utvikle resistens mot Cry1F-, Cry34Ab1- og Cry35Ab1-proteiner som uttrykkes i 1507x59122 planter. Dette vil igjen medføre at *Bt*-baserte plantevernmidler ikke kan nyttes i kontroll av disse herbivorene i andre kulturer.

9. Samspill mellom GMP og ikke-målorganismer

I følge søker har ikke økotoksikologiske studier av Cry1F-, Cry34Ab1- og Cry35Ab1-proteiner vist signifikante effekter på ikke-målartropoder som gulløye (*Chrysoperla carnea*), 2 arter av mariehøne (*Hippodamia convergens*, *Coleomegilla maculate*), parasittvepsene *Nasonia vitripennis* og *Brachymeria intermedia*, honningbie (*Apis mellifera*) eller løpebillen *Poecilus cupreus*. Det er heller ikke påvist effekter av Cry34Ab1/ Cry35Ab1 på voksne individer av *D. virgifera virgifera*.

Cry1F

Toksisitetsstudier

Det er kun publisert et fåtall vitenskapelige studier av effekter av Cry1F-protein på ikke-målorganismer av evertebrater (Defra 2006). Tilsvarende det mer studerte *Bt*-toksinet Cry1Ab, er Cry1F hovedsaklig toksisk for arter i ordenen *Lepidoptera*. Det er imidlertid forskjeller mellom disse Cry-proteinene med hensyn på spesifisitet overfor lepidoptera-larver, og overføringsverdien er derfor omdiskutert. I følge dokumentasjonen fra Pioner Hi-Bred/Mycogen Seeds er nivået av Cry1F som uttrykkes i maispollen gjennomsnittlig 26,8 µg/g tørrvekt

Cry1F har vist seg å være betydelig mindre toksisk for larver av monarksommerfuglen (*Danaus plexippus*) sammenlignet med Cry1Ab-toksinet (Hellmich et al. 2001). I denne studien ble larvene føret med en diett med konsentrasjoner av Cry1F opp til 10.000 ng/ml over en 7-dagersperiode. Det ble observert noe vekstreduksjon, men ingen økt dødelighet ved den høyeste konsentrasjonen av Cry-protein. Siden dette langt overstiger forventet nivå under naturlige betingelser, konkluderte EPA at Cry1F vil ha negative effekter på denne arten (EPA 2001).

Det er ikke publisert toksisitetsstudier av Cry1F relatert til europeiske *Lepidoptera*-arter (Defra 2006). Det er vist at Cry1F er toksisk for noen arter av sommerfugler, eksempelvis egyptisk bomullsfly (*Spodoptera littoralis*) (Natural Resources Canada 2006). Cry1F-proteinet ser også ut til å være toksisk for enkelte arter i familien glansvinger (*Lycaenidae*) (Herrero et al. 2002; Wolt et al. 2005).

Resultater av føringforsøk presentert av søker viser ingen negative effekter av Cry1F-toksinet på indikatorarter som honningbie, gulløye, mariehøne eller parasittiske veps. Larver av honningbie

(*A. mellifera*) som ble føret med pollen og rent protein med Cry1F viste normal utvikling og atferd, og ingen økt dødelighet.

Honningbier er sannsynligvis det mest studerte ikke-målinsektet med hensyn på mulige virkninger av konvensjonelle pesticider. I nyere undersøkelser som er presentert i forbindelse med søknader om godkjenning av *Bt*-sorter er det ikke rapportert om negative effekter verken på larver eller voksne individer ved eksponering for δ -endotoksiner eller toksinholdig pollen (inkludert Cry1F)(OECD 2007). Hanley et al. (2003) har undersøkt effekt av pollen fra maislinje 1507 og *Bt11* på dødelighet hos larver og pupper av honningbier. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom grupper føret med pollen fra ulike kilder på noen av de undersøkte parametere. Wolt (2005) viser også til tilsvarende resultater fra forsøk med føring av bielarver med bakterielt Cry1F-protein (640 μg /larve) og pollen fra mais1507 (2 mg/larve). I en oversiktsartikkel av Malone og Pham-Delegue (2001) er resultater fra ulike undersøkelser av effekter av *Bt*-planter på honningbier og humler (*Bombus* spp.) diskutert. Resultater så langt tyder på at direkte effekter av transgene planter på pollinerende insekter varierer sterkt avhengig av type transgen og den biologiske aktiviteten til proteinet som uttrykkes. Når det gjelder *Bt*-toksiner som er spesifikke for *Lepidoptera*-arter konkluderer forfatterne med at det er svært lite sannsynlig at disse vil påvirke bier og humler. Disse konklusjonene underbygges av seinere studier.

Føringsforsøk med konsentrasjoner på 15 ganger normalt nivå i pollen, viste ingen økt dødelighet eller andre negative effekter på voksne individer av mariehønearten *Hippodamia convergens* eller larver av gulløye over en forsøksperiode på henholdsvis 29 og 13 dager. Søker viser også til at forsøk med parasittvepsen *Brachymeria intermedia* over 12 dager heller ikke har vist negative effekter av Cry1F ved høye konsentrasjoner av toksinet. EPA (2001) konkluderer med at det ikke kan forventes negative effekter på disse indikatorartene ved normale eksponeringsnivå i felt.

Feltstudier

I følge Pioneer Hi-Bred/Mycogen Seeds viser feltstudier små eller ingen negative effekter av Cry1F-toksin på antall individer av predatorerne mariehøne (*Cycloneda munda* og *Coleomegilla maculate*), løpebiller, *Micromus tasmaniae* ('brown lacewing'), gulløye, *Orius insidiosus*, ulike tegearter (Reduviidae, Nabidae), øyestikkere, edderkopper og parasittveps (Ichneumonids og Braconids) (Mycogen & Pioneer 2001e). I følge Defra (2006) er det ikke publisert feltstudier av Cry1F-mais og effekter på ikke-målorganismer.

Cry34Ab1/Cry35Ab1

Med unntak av en studie av resistensproblematikk i maislinjen 59122 (Storer et al. 2006), er det etter det Faggruppen kjenner til ikke publisert uavhengige vitenskapelige undersøkelser som belyser mulige effekter på ikke-målorganismer av Cry34Ab1/Cry35Ab1-toksiner.

Toksisitetsstudier

I følge dokumentasjon fra Pioneer Hi-Bred/Mycogen Seeds er nivået av *Bt*-toksin som uttrykkes i maispollen gjennomsnittlig 74,27 $\mu\text{g/g}$ og 0,02 $\mu\text{g/g}$ tørrvekt av henholdsvis Cry34Ab1 og Cry35Ab1. Søker har utført akuttoksisitetsstudier med Cry34Ab1/Cry35Ab1-toksiner på ulike ikke-målartropoder. Føringsstudier utført på voksne individer av mariehønearten *Hippodamia convergens* viste ingen negative effekter. I en tilsvarende undersøkelse av *Coleomegilla maculate*, ble det rapportert om redusert vekst, men ikke økt mortalitet hos larver som ble føret med Cry34Ab1-protein. Eksponeringsnivået var 10 ganger høyere enn det som normalt uttrykkes i pollen av maislinjen 59122, og i en oppfølgingsstudie, der mariehønelarvene fikk en diett med lavere konsentrasjoner av Cry-toksin, ble det ikke påvist effekter på larveutviklingen. Søker konkluderer derfor med at eksponering for 59122 ikke vil medføre subletale effekter på *C. maculate*.

Søker har gjennomført en forsøksserie for å undersøke spesifisiteten av det binære proteinet Cry34Ab1/Cry35Ab1 overfor ulike herbivorer som maispyralide, 'corn earworm' (*Helicoverpa zea*), stort jordfly (*Agrostis ipsilon*) og bladlus (*Rhopalosiphum maidis*). Ingen av disse artene viste høyere

dødelighet når de ble eksponert for mikrobielt uttrykte Cry34/Cry35-proteinene sammenlignet med kontrollinjene (APHIS 2005).

Akutte toksikologiske studier der ulike nytteinsekter ble føret med maispollen og/eller mikrobielt produsert Cry34Ab1/Cry35Ab1-protein med konsentrasjoner 10 til 100 ganger over det som forventes i felt er vurdert. Det ble ikke observert effekter på overlevelse og utvikling hos gulløye eller snylteveps. Snylteveps er ingen typisk art i og omkring maisfelt, og søkers valg av snylteveps som indikatorart har derfor vært kritisert. Studien av gulløye er også vurdert irrelevant siden *Bt*-toksinene ble tilbudt i form av diett av sommerfuglegg som ikke medfører eksponering av predator. Føringstudier med honningbie (*Apis mellifera*) viste ingen effekter på larveutvikling eller adferd hos voksne individer.

I dokumentasjon fra Pioneer Hi-Bred/Mycogen Seeds er det ikke presentert resultater fra toksikologiske studier med arter i familien bladbiller (*Chrysomelidae*).

Feltforsøk

Pioneer Hi-Bred/Mycogen Seeds har gjennomført feltforsøk med maislinje 59122 på to lokaliteter i USA i 2001 og 2002, der populasjoner av artropoder enten ble overvåket visuelt eller ved i ulike typer feller ('sticky traps', 'pitfall traps', 'litter bags'). Det ble foretatt registreringer av egg, larver og imago av mariehøner, samt rovbiller (*Staphylinoidea*), løpebiller (*Pterostichus* ssp, *Harpalus* ssp) og gulløye (egg). I tillegg ble forekomst av ulike herbivorer (bladlus, sikader, trips), predatorer og parasitoider vurdert. Med unntak av reduksjoner i forekomsten av rovbiller på en lokalitet i en forsøks sesong, ble det ikke rapportert om forskjeller mellom forsøksfelt med *Bt*-planter og konvensjonelle maisplanter på samfunnsnivå. Dette ble tilskrevet normal feltvariasjon. Det er imidlertid satt i gang oppfølgingsstudier for avdekke mulige negative effekter av det binære Cry34Ab1/ Cry35-toksinet på arter av rovbiller (Defra 2006).

I Europa har søker gjennomført en studie av ikke-mållartropoder i maisfelt. Forsøket ble utført på en lokalitet i Spania i 2005, og inkluderte både maislinje 59122 og hybrid 1507x59122. Feltene ble visuelt overvåket, i tillegg til at ulike typer feller ble benyttet for å registrere antall herbivorer (bladlus, sikader, gresshopper, trips), parasitoider og predatorer. Det ble ikke funnet forskjeller mellom felt med *Bt*-planter og ikke-transgene planter på samfunnsnivå. Forsøkene ble imidlertid utført på små forsøksruter (30 x 30 m) seint i vekstsesongen, og det ble gjort svært få observasjoner per forsøksrute. I presentasjonen av overvåkede taxa er det registrert voksne individer av herbivore biller (bladbiller) (*Chrysomelidae*), mens antallet egg og larver av denne gruppen var for lavt til å kunne kjøre statistiske analyser. Søker presenterer kun gjennomsnittsverdier uten varianser, noe som gjør tolkingen av resultatene problematisk.

Rødlistede arter

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

298 rødlistede billearter i Norge er knyttet til jordbrukslandskap.

Delkonklusjon

Den eneste målorganismen for *Bt*-toksiner i maislinjen 1507x59122 som er registrert i Norge er maispyralide (*Ostrinia nubilalis*). *O. nubilalis* er imidlertid ikke rapportert som skadegjører i Norge, og det er ingen godkjente insekticider til bruk mot denne skadegjøreren.

Det er publisert svært få vitenskapelige undersøkelser som belyser mulige effekter av *Bt*-toksinene Cry1F og Cry34Ab1/Cry35Ab1 på ikke-målartropoder. Det er ikke publisert toksisitetsstudier av Cry1F relatert til *Lepidoptera*-arter som er utbredt i Europa, og det foreligger lite dokumentasjon på mulige effekter av Cry34Ab1/Cry35Ab1-proteinene på ikke-målorganismer, spesielt fra arter i samme taksonomiske gruppe som målorganismene. Det er behov for representative studier av pollinatorer/pollenspisende insekter, predatorer, parasitoider. I Norge er imidlertid dyrkingsarealet med mais så begrenset at risiko for ikke-målartropoder ansees som ubetydelig.

Potensialet for utvikling av resistens mot Cry1F er en svært kompleks problemstilling. På den ene siden vil de svært begrensede maisarealene i Norge i seg selv være velegnet til å motvirke resistens i tråd med anbefalt dyrkingspraksis. På den andre siden er populasjonene av *O. nubilalis* for nærværende små og isolerte. Hvis det skulle utvikles resistens i en region vil det derfor være en svært begrenset ikke-resistent populasjon av målinsektet tilstede til 'å tynne ut' resistensallelene i genpoolen

FG3s innspill på EFSA-nett:

The sensitivity to the Cry34Ab1/Cry35Ab1 binary toxins should be determined for Coleoptera species representative of agricultural environments in Europe. Since the native toxin is specific to chrysomelid pests, at least the effects on other Chrysomelidae should be evaluated. Based on the results of the above study, adequate data on field trials in Europe may be necessary to conclude on the risk assessment of dossier EFSA/GMO/NL/2005/28. Except for a single field trial in Spain in 2005, non-target studies assessing the effects of Cry34Ab1/Cry35Ab1 toxins provided by the applicant, refers to American conditions and species. It would be of particular interest to know if any endangered or threatened Coleoptera species use maize as a food source, or feed on other organisms that may accumulate Cry-toxins.

10. Potensiale for samspill med abiotisk miljø og eventuelle effekter på biogeokjemiske prosesser

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

I følge søker er det ikke observert umiddelbare og/eller forsinkede effekter på biogeokjemiske prosesser som følge av potensielle direkte og indirekte vekselvirkninger mellom 1507x59122 og ikke-målorganismer i nærheten av utsettingsstedet. I dokumentasjonen fra Pioneer/Mycogen Seeds henvises det til undersøkelser av indikatorartene meitemark (*Eisenia fetida*), spretthale (*Folsomia candida*), samt løpebillen *Poecilus cupreus*. Fire ukers reproduksjonstester med spretthaler viste ingen effekter ved konsentrasjoner på henholdsvis 0,63, 3,1 og 12,5 µg Cry1F pr. 100 g fôr. En 14-dagers test med meitemark viser heller ikke effekter på overlevelse ved eksponering for en konsentrasjon av Cry1F-proteinet på 2,26 mg/g tørr jord. Tilsvarende studier av mikrobielt produsert Cry34Ab1/Cry35Ab1-toksiner viste ingen effekter på disse organismene. I nevnte undersøkelser var eksponeringsnivåene betydelig høyere enn det som forventes under normale feltforhold. Ingen av studiene som presenteres av søker har undersøkt effekter av Cry-proteinene i kombinasjon.

I litteraturen finnes mange studier av mais som uttrykker *Bt*-toksinet og dens skjebne og effekter i jordmiljøet. De fleste undersøkelser av mulige effekter av slike toksiner i jordmiljø er relatert til mais som uttrykker Cry1Ab-protein (*Bt*11, *Bt*176, MON810). Det finnes en lang rekke laboratoriestudier og omfattende feltstudier som viser fravær av effekter av *Bt*-toksiner på nedbrytningsprosesser, mikrobiell samfunnsstruktur og et bredt spekter av jordlevende organismer under relevante eksponeringsbetingelser (Sims og Martin 1997; Escher et al., 2000; Glare og O'Callaghan, 2000; Saxena og Stotzky, 2001; Koskella og Stotzky, 2002; Griffiths et al., 2005; Cortet et al., 2006; Vercesi et al., 2006).

Det er vist at *Bt*-toksiner initielt brytes relativt raskt ned i jord, men at mindre restmengder kan forbli i jorden i flere år (Vettori et al. 2003; Hopkins og Gregorich, 2003), noe som indikerer potensial for langtidseksponering av jordlevende organismer. I laboratorieforsøk som ble publisert i 2001 og 2002 ble halveringstiden (DT_{50}) for mikrobielt produsert Cry1F-toksin estimert til under et døgn (Herman et al. 2001, 2002b). Tilsvarende estimater av DT_{50} for Cry34Ab1/Cry35Ab1 er 3,2 dager (APHIS 2005). Vettori et al. (2003) viste i sine undersøkelser med konvensjonelle insekticider at *Bt*-toksiner i form av krystaller er persistent i jord i minst 28 måneder. Zwahlen et al. (2003a) har publisert resultater fra to sveitsiske feltstudier der nedbryting av Cry1A(b)-toksin fra blad av *Bt*11-mais ble registrert gjennom høst, vinter og vår i en periode på 200 dager. Ved slutten av forsøksperioden var 0,3 % av det opprinnelige proteinet fortsatt til stede i jorda. En annen studie med ulike maislinjer fra MON 810 og *Bt*11 viste at omfanget av lignifisering av *Bt*-mais ikke er forskjellig fra kontrollinjer (Jung og Scheaffer 2004).

I et laboratorieforsøk av Flores et al. (2005) ble nedbryting av ulike arter som uttrykte *Bt*-toksiner analysert, og resultatene diskutert i relasjon til lignininnhold og potensielle miljømessige konsekvenser. Generelt hadde planterester av nær-isogene linjer av konvensjonell mais høyere CO₂-produksjon sammenlignet med *Bt*-mais, effekter som ikke kunne relateres til forskjeller i C/N-forhold, lignininnhold eller mikrobiell aktivitet. Som et ledd i EU-prosjektet ECOGEN har Cortet et al. (2006) undersøkt effekter av Cry1Ab-protein på nedbryting av hvetealm i felt på 3 klimatiske ulike lokaliteter i Europa (Danmark og Frankrike). I undersøkelsen ble *Bt*-mais og konvensjonelle, nær-isogene linjer dyrket på 3 ulike jordarter og i tråd med vanlig dyrkingspraksis. Resultater etter 4 måneder viste at

nedbryting og mineralisering av organisk materiale primært var knyttet til effekter av klimaforhold. Det ble ikke påvist effekter av *Bt*-toksinet.

Mesteparten av Cry- og PAT-proteinet vil denatureres av enzymaktivitet i fordøyelseskanalen og mikrobielle prosesser vil føre til en ytterligere nedbryting av proteiner i gjødsla. Dette medfører at svært lite PAT- og Cry-proteiner blir spredt med husdyrgjødsel på dyrket mark, som igjen minimerer faren for eksponering av potensielt sensitive ikke-målorganismer.

Spretthaler (*Collembola*) er vanlig i jordbruksjord, og har betydning for nedbryting av organisk materiale. I studier av effekter av *Bt*-toksinet Cry1Ab på *F. candida* føret Clark og Coats (2006) spretthalerne med oppmalt bladmateriale av mais. Forskjeller i vekst hos ikke-målorganismene ble relatert til forskjeller i næringsinnhold i de to sortene som ble benyttet i forsøket, og ikke til selve *Bt*-toksinet. Disse resultatene er i overensstemmelse med konklusjonene fra ECOGEN-prosjektet (Cortet et al. 2007). Studien ble utført på 4 lokaliteter, 2 i Frankrike og 2 i Danmark. Forsøksstedene i Danmark er klimatisk sammenlignbare med aktuelle dyrkingsområder for mais i Norge. Undersøkelsen viser at de minimale forskjellene i forekomst av små jordlevende artropoder som er påvist mest sannsynlig hadde sammenheng med maissort og ikke *Bt*-toksinet i seg selv. Heckmann et al. (2006) fant forskjeller i atferd/opptreden hos spretthaler når de ble føret med gjær i forhold til mais, men ingen forskjeller mellom *Bt*-mais og ikke-transgen mais.

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

Det finnes enkeltstudier som viser små, men signifikante effekter av *Bt*-toksin. En langtidsstudie av Zwahlen et al. (2003b) viste redusert vekst (18 %) av meitemark (*Lumbricus terrestris*) i en 200 dagers laboratoriestudie. Det ble ikke funnet forskjeller i dødelighet mellom gruppene som ble behandlet med henholdsvis *Bt*-mais og konvensjonell mais. Det var imidlertid ikke mulig å si om vekstforskjellene var relatert til toksinet eller andre faktorer. Blackwood og Buyer (2004) har undersøkt effekter av transgen mais som uttrykte henholdsvis Cry1F-protein (1507) og Cry1Ab-protein (*Bt11*) på jordmikrobiell samfunnsstruktur i tre jordarter med ulik tekstur. Resultatene fra vekstkammerforsøket viste kun signifikante effekter av *Bt*-toksin på mikrobiell samfunnsstruktur i leirjord. En antar at *Bt*-mais forårsaker rask vekst i populasjonene av spesielle mikroorganismer på grunn av økt proteininnhold, og at jordtyper med et høgt innhold av leire øker retensjon av Cry-proteiner.

Douville et al. (2005) har undersøkt nivå av Cry1Ab-toksin i akvatiske miljø i Canada. I undersøkelsen ble det tatt prøver av overflatevann, jord og sedimenter fra vassdrag med avrenning fra dyrkingsarealer med henholdsvis *Bt*-mais og konvensjonelle maissorter som ble sprøytet med insekticider. Resultatene viste at nedbrytingen av endotoksinet gikk raskere i vann enn i jord (halveringstid 4 og 9 dager), mens for krystaller fra pesticidene var nedbrytingstiden lengre. Nivået av Cry1Ab-proteinet i prøver fra sedimenter og overflatevann varierte fra 0,1 til 1 ng/g eller ng/ml. I flertallet av prøvene var imidlertid toksin-nivået under deteksjonsgrensen. I en oppfølgingsstudie fra 2007 undersøkte Douville et al. forekomst og persistens av *cry1Ab*-genet i vassdrag i nærheten av dyrkingsfelt med *Bt*-mais. Resultatene av undersøkelsen viste at genet var persistent i 21 og 40 dager i henholdsvis overflatevann og i sedimenter, og med høyest konsentrasjon i sedimentprøver. Transgenet ble detektert i avstander opp til 82 km fra dyrkingsfeltene.

Det er vist at larver av vårfluer (*Tricoptera*), arter som er nært beslektet med *Lepidoptera*, er sensitive for Cry1Ab-toksinet (Rosie-Marshall et al. 2007). Disse laboratorieforsøkene viste redusert vekst og økt mortalitet hos vårfluelarver ved inntak av pollen og dødt plantemateriale fra *Bt*-mais.

Målinger i felt av samme forskergruppe har imidlertid ikke påvist effekter av *Bt*-pollen på vekst og dødelighet av arter fra vårflueslektene *Hydropsyche* og *Cheumatopsyche* (Pokelsek et al. 2007).

Det er publisert få studier som er relatert til effekter av herbicidresistente planter på jordlevende organismer og jordmiljø. Som et ledd i EU-prosjektet ECOGEN har Krogh et al. (2007) undersøkt mulige virkninger av redusert jordarbeiding på populasjoner av meitemark i dyrkingssystemer med henholdsvis GA-tolerant mais og konvensjonelle maissorter. Studien, som kun ble foretatt på en lokalitet i Danmark i 2004 og 2005, viste signifikante reduksjoner i antall og biomasse av meitemark i plot med herbicidresistent mais sammenlignet med ikke-transgen mais. Effektene ble tilskrevet eksponering for herbicidet Basta. Det ble ikke funnet noe entydig mønster med hensyn på effekter av jordbearbeiding på ulike arter av meitemark. I nevnte ECOGEN-prosjekt er det også vist små forskjeller mellom dyrkingssystemer med hensyn på effekter på mikrobiell samfunnsstruktur (Griffiths et al. 2007). Størst effekt på jordpopulasjoner var knyttet til ulik jordarbeiding. Holland (2004) konkluderer at både mikroorganismer, meso- og makrofauna blir stimulert av redusert jordarbeiding.

Delkonklusjon

Basert på de oppgitte egenskaper til maishybriden 1507x59122, vedlagt dokumentasjon, samt informasjon i åpen litteratur har det ikke blitt funnet signifikante effekter av 1507x59122 på jordlevende organismer. Det er imidlertid betydelige kunnskapsmangler med hensyn på effekter av de aktuelle Cry-proteinene på jordorganismer. Ved anbefalt dyrkingspraksis med vekstskifte vil potensielle effekter på jordlevende organismer og jordmiljø trolig være ubetydelige. Det finnes enkeltstudier som viser små, men signifikante effekter av *Bt*-toksin på jordlevende organismer. Det er også kunnskapsmangler med hensyn på effekter av toksinet på vannlevende organismer. Konsentrasjonene av *Bt*-endotoksiner er imidlertid vist å være svært lave i akvatiske systemer og eventuell eksponering på disse organismene vil være marginal.

11. Potensiale for effekter på agroøkologiske forhold, dyrkingspraksis etc.

11.1. Dyrkingspraksis

Mais er en kultur som må dyrkes med stor radavstand, og med stor avstand mellom planter i raden for å oppnå skikkelig utvikling. Maisplantene vokser seint i starten og er lite konkurransedyktig overfor ugras. Ugrasbekjempelse er derfor helt påkrevet.

Ved konvensjonell bruk av selektive herbicider er det snakk om gradsforskjeller i toleranse mellom kulturplanten og ugras, og sprøyting blir utført når kulturplantene er tilstrekkelig utviklet til å tåle herbicidet, ikke nødvendigvis når ugraset er mest følsomt. I henhold til opplysningene fra Pioneer/Mycogen Seeds vil introduksjon av glufosinattolerante planter åpne for en mer fleksibel ugrasbekjempelse der dyrkerne kan velge sprøytetidspunkt mer uavhengig av veksternes utviklingstrinn. Dette gir mulighet for en mer målrettet bruk med seinere sprøyting, færre behandlinger og redusert jordarbeiding sammenlignet med konvensjonell bruk av selektive herbicider. I følge søker vil bruk av herbicidtolerante sorter med denne eventen medføre redusert bruk av persistente jordherbicider, og overgang til bladherbicider med kortere nedbrytningstid i jord, mindre lekkasje til grunnvann, og lav toksisitet for ikke-målorganismer.

I dokumentasjon fra søker refereres det til undersøkelser av Phipps og Parks (2002), som har sammenlignet bruk av herbicider i standard sprøyteprogram i henholdsvis Storbritannia og EU for øvrig, med dyrking av herbicidresistente maissorter (glyfosat og glufosinat). Resultatene av disse undersøkelsene viste en reduksjon i bruk av aktivt stoff på totredjedeler i dyrkingsfelt med herbicidresistente sorter sammenlignet med konvensjonell dyrking. Sammenligningen er blant annet gjort med atrazin, et persistent jordherbicid som har vært mye brukt i mais i UK, men som ble totalforbudt i EU i 2004 (Kommisjonsbeslutning 2004/248/EF). Undersøkelser av Brookes og Barfoot (2005) viser også små, men signifikante reduksjoner i bruk av herbicider i mais i USA og Canada. En ISAAA-rapport fra 2006 (Brookes og Barfoot 2006) hevder at endret dyrkingspraksis ved introduksjon av glufosinatresistente maissorter har ført til færre sprøytinger og mindre jordarbeiding, med tilhørende redusert bruk av landbruksmaskiner, redusert utslipp av CO₂ og bedret økonomi for dyrkerne. Andre publiserte studier dokumenterer imidlertid økt bruk av sprøytemidler ved bruk av herbicidresistente sorter (Benbrook 2001, 2003). Det er imidlertid store variasjoner mellom kulturer og regioner, noe som gjør at det er vanskelig å trekke klare konklusjoner. Etter det faggruppen kjenner til er det ikke foretatt sammenligninger av dyrkingsregimer med GA-tolerante maislinjer og konvensjonell produksjon med relevante herbicider for norske dyrkingsforhold.

11.2. Biodiversitet

Når det gjelder effekter av herbicidtolerante planter på biodiversiteten i jordbruksarealer er det bekymring knyttet til at ugraskontrollen med bredspektrede herbicider skal bli så effektiv at det vil medføre nedgang i antall arter som lever i og omkring dyrkingsarealer på lengre sikt (Heard et al. 2005). Søker hevder at dyrking av GA-resistent mais vil ha positiv effekt på biodiversiteten i landbrukshabitater sammenlignet med konvensjonelle dyrkingssystemer. Dette relateres til utsatt og redusert herbicidbruk og større tetthet av ugras i store deler av vekstsesongen. I søknaden refereres det til en omfattende undersøkelse fra Storbritannia (Farm Scale Evaluations (FSE)), der ulike biodiversitetsindikatorer i dyrkingsfelt med henholdsvis transgene sorter og konvensjonelt dyrkede sorter av fôrmais, sukkerbete og oljeraps ble evaluert. Studien pågikk i perioden 2000-2003, og for hver art ble tetthet og spekter av ugrasarter og evertebrater undersøkt i om lag 60 ulike forsøksfelt. Registreringene ble foretatt både på landbruksarealer og omkringliggende arealer. Ved bruk av herbicidprogrammer med glufosinat-ammonium ble det påvist redusert antall og biomasse av tofrøbladete ugras på arealer med transgen oljeraps og sukkerbete, mens det for mais ble påvist en økning sammenlignet med konvensjonell dyrkingspraksis. Det ble ikke funnet signifikante effekter av behandling på botanisk diversitet eller frøbank i forsøksfeltene med mais (Heard et al. 2003). Det ble

heller ikke rapportert om effekter av ulike dyrkingssystemer på vegetasjonen i randsonene til dyrkingsfeltene (Roy et al. 2003).

Populasjonene av ulike herbivorer, saprofager, pollinatorer, predatorer og parasitoider som ble studert viste seg å være mer influert av årstid og kultur enn dyrkingsregime (Hawes et al. 2003). Individtallet av flere grupper av evertebrater økte 2-5 ganger mellom for- og seinsommer. Tettheten av spretthaler (*Collembola*) var imidlertid gjennomgående høyere i felt med herbicidresistente sorter sammenlignet med konvensjonelle dyrkingsfelt (Brooks et al. 2003; Haugthon et al. 2003). Dette ble relatert til større mengde organisk materiale. Som et resultat av færre blomstrende ugras ble det påvist reduksjoner i forekomst av sommerfugler og bier i sukkerbete og raps, mens det i maisfelt ble registrert et større antall evertebrater generelt. Det ble ikke påvist forskjeller i forekomsten av sommerfuglarter i randsonene av herbicidresistente maisfelt sammenlignet med forsøksfelt med konvensjonelle dyrking. Forfatterne bak FSE-undersøkelsen konkluderer med at forskjellene som ble avdekket i denne studien ikke er relatert til introduksjon av transgene planter, men til effekter av ulike sprøytestrategier mellom herbicidresistente sorter og konvensjonell dyrking.

I FSE-studien ble GA-tolerant mais sammenlignet med konvensjonelle sorter som i 75 % av forsøksfeltene ble behandlet med atrazin. Herbicidet er svært toksisk for evertebrater, og forfatterne har ikke vurdert effekter av forskjeller i toksisitet mellom herbicidene. Etter det faggruppen kjenner til er det ikke foretatt tilsvarende studier med dagens godkjente herbicider. Det hevdes imidlertid i en seinere studie at den komparative fordelene på biodiversitet vil reduseres, men ikke elimineres (Perry et al. 2004).

11.3. Resistensutvikling

Økt bruk av enkelte herbicider som følge av dyrking av herbicidresistente planter kan medføre økt seleksjonsintensitet og økt mulighet for resistensutvikling i ugraspopulasjoner. Utviklingen av herbicidresistens i planter påvirkes primært av seleksjonsintensitet (i form av herbicidets virkemåte, dosering og persistens, sprøytehyppighet), dyrkingspraksis og vekstskifte, ugrasartenes generasjonstid, genetiske faktorer og relativ fitness hos resistente og følsomme genotyper (Rognli 1994). Det er ikke funnet resistens mot glufosinat-ammonium i ugraspopulasjoner til nå, men det er påvist lavere sensitivitet hos enkelte arter av *Viola*, *Equisetum*, *Sedum* m.fl. (ref. Scütt et al. 2004).

I følge Sanvido et al. (2005) viser tilgjengelige data fra områder der det har vært dyrket herbicidresistente planter over lengre tid at resistensutvikling generelt ikke er knyttet til introduksjon av transgene sorter, men til agronomisk praksis.

12. Miljøovervåkingsplan

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

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

I følge Pioneer/Mycogen Seeds identifiserer miljørisikovurderingen ingen umiddelbar, forsinket, direkte eller indirekte risiko for human eller dyrehelse eller miljø knyttet til introduksjon av genene *cry*-genene eller *pat*-genet i maishybriden 1507x59122, eller til dyrkingsregimet for den herbicidtolerante maislinjen. Søker vurderer imidlertid at det er en begrenset mulighet for utvikling av resistens hos målinsekter for denne transformasjonen. Det anbefales derfor særskilt overvåking av forekomst av resistens mot Cry1F-, Cry34Ab1- og Cry35Ab1-proteiner som uttrykkes i 1507x59122-planter. I planen som presenteres av Pioneer/Mycogen Seeds er intensjonen å overvåke resistensutvikling i populasjoner av målorganismene *Ostrinia nubilatis*, *Sesamia nonagrioides* og *Diabrotica virgifera virgifera* i felt, samt minimere og forsinke eventuell resistensutvikling. Ved dyrking av mer enn 5 ha med maislinjen 1507x59122 stilles det krav om refugearealer. Refuger, uten noen nedre grense av dyrket areal i Norge.

I Pioneer/Mycogen Seeds plan for case spesifikk overvåking inngår det ikke planer for overvåking av ikke-målorganismer arter i insektordene *Lepidoptera* og *Coleoptera*.

Det inngår ikke overvåking av truede arter av bladbiller (*Chrysomelidae* spp.) eller sommerfugler (e.g. *Noctuidae* spp.(nattfly), *Crambidae* spp.(gressmøll) i maisfelt og tilgrensende områder.

For at overvåkingsplanen skal være i tråd med gjeldene regelverk er det etter Faggruppens vurdering nødvendig å evaluere kort- og langtidseffekter av dyrkingspraksis som omfatter bruk av relevant herbicid. Dette gjelder både effekter av endret jordarbeiding og av direkte og indirekte effekter av sprøyeregimet. Det er nødvendig å overvåke effekter av herbicidtolerante planter på biodiversiteten i landbrukshabitater og omkringliggende arealer. Dette gjelder både effekter på ugraspopulasjoner og arter av som lever på eller i tilknytting til dyrkingsarealer. Videre må overvåkingsplanen ta i betraktning risiko for resistensutvikling hos ugrasarter som resultat av økt bruk av bredspektrede herbicider. Særskilt overvåking skal utføres over en tidsperiode som er tilstrekkelig lang til at så vel umiddelbare og direkte virkninger som forsinkede og indirekte virkninger kan oppdages.

13. Vurdering av søkers dokumentasjon

- Det er ikke publisert toksisitetsstudier av Cry1F-proteiner relatert til *Lepidoptera*-arter som er utbredt i Europa
- Effekter av det binære toksinet Cry34Ab1/Cry35Ab1 på ikke-målorganismer av ordenen biller (*Coleoptera*) er i liten grad undersøkt. Siden toksinet er spesifikt for arter i familien bladbiller (*Chrysomelidae*), etterlyser Faggruppen data fra studier av relevante arter i europeisk sammenheng.
- Søker har kun presentert felldata fra en vekstsesong i Europa. Det er behov for forsøk i flere representative dyrkingsområder og forsøksdesign som gir større statistisk styrke.

KONKLUSJON

Maishybriden 1507x59122 inneholder de bakterielle genene *cry1F*, *cry34Ab1* og *cry35Ab1*, som koder for δ -endotoksiner som gir resistens mot enkelte skadeinsekter i ordenen *Lepidoptera* og arter i billeslekten *Diabrotica*. I tillegg inneholder 1507x59122 *pat*-genet som gjør at disse maisplantene kan tolerere høyere doser av sprøytemiddelet glufosinat ammonium sammenlignet med konkurrerende ugras. Glufosinat er per i dag ikke godkjent for bruk i mais, verken i Norge eller EU. En fullstendig miljørisikovurdering knyttet til dyrking av 1507x59122 med bruk av dette herbicidet er derfor ikke foretatt.

Med unntak for de introduserte egenskapene er ikke 1507x59122 forskjellig fra konvensjonelle maislinjer med hensyn på karakterer knyttet til overlevelse, reproduksjon og spredning. Det vurderes ikke å være økt risiko for utvikling av ugraspopulasjoner av mais i dyrkingsmiljø eller spredning og etablering utenfor dyrking. Det er ingen viltvoksende arter i den europeiske flora som mais kan hybridisere med, og vertikal genoverføring vil være knyttet til krysspollinering med konvensjonelle og eventuelle økologiske sorter. I tillegg vil utilsiktet innblanding av genmodifisert materiale i såvare representere en mulig spredningsvei for transgener mellom ulike dyrkingssystemer.

Det er betydelige kunnskapsmangler med hensyn på effekter av de aktuelle *Bt*-toksinene på ikke-målorganismer i Europa. Ved en eventuell dyrking av maishybriden 1507x59122 i Norge, vurderes risiko for ikke-målartropoder som lever på eller i nærheten av maisplanter til å være liten/ubetydelig. Arealene med mais i Norge er så små at det er lite sannsynlig at eventuell negative effekter av *Cry1F*- og *Cry34/35Ab1*-toksinene vil medføre noen trussel for disse organismene. Risiko for negative effekter på jordlevende organismer vurderes til å være minimal. Det er kunnskapsmangler med hensyn på effekter av toksinet på vannlevende organismer. Konsentrasjonene av *Bt*-endotoksiner i akvatiske systemer er imidlertid vist å være svært lav, og eventuell eksponering på disse organismene vil være marginal.

Det er noe usikkerhet knyttet til potensiale for utvikling av resistens hos målorganismene under norske dyrkingsbetingelser. Undersøkelser av biodiversitet på arealer med herbicidresistent transgen mais tyder ikke på negative effekter sammenlignet med konvensjonell dyrkingspraksis.

Målorganismene for denne transformasjonen er ikke rapportert som skadegjørere i norsk landbruksproduksjon, og det vil derfor ikke være noen nytteverdi av å introdusere plantesorter med resistens mot *Cry1F* og *Cry34Ab1/Cry35Ab1* under våre dyrkingsforhold.

Samlet vurdering

Det er betydelige kunnskapsmangler relatert til effekter av *Bt*-toksinene *Cry1F* og *Cry34Ab1/Cry35Ab1* på ikke-målgrupper av terrestriske og akvatiske organismer. I norsk sammenheng, og sett i forhold til annen mais, finner likevel Faggruppen at maishybriden 1507x59122 har en lav risiko for effekter på miljø.

REFERANSER

- APHIS (2005) Environmental Assessment for DOW/Pioneer Rootworm resistant Corn. Approval of Mycogen Seeds/Dow Agro Sciences LLC and Pioneer Hi-Bred International Inc. Request 03-353-01p seeking a Determination of the Non-regulated Status for Bt Cry34Ab1/35Ab1 Insect Resistant, Glufosinate Tolerant Corn Line 59122-7, 45pp, US animal and plant Health Inspection Service, USDA.
- Bakken AK, Nesheim L, Harbo O, Johansen A & Wikmark T (2005) Potensial for dyrking av fôrmais i Norge. Grønn kunnskap 9 (106):1-6.
- Benbrook C (2001) Do GM crops mean less pesticide use? Pesticide Outlook 204-2007.
- Benbrook C (2003) Impacts of genetically engineered crops on pesticide use in the United States: the first eight years. BioTech InfoNet.
- Blackwood CB & Buyer JS (2004) Soil microbial communities associated with Bt and non-Bt corn in three soils. Journal of Environmental Quality 33:832–836.
- Brookes G, Barfoot P, Mele E, Messeguer J, Benetrix D, Fouellassar X, Fabie A & Poeydomenge C (2004) Genetically Modified Maize: Pollen movement and crop coexistence PG Economics.
- Brookes G & Barfoot P (2005) GM crops: the global economic and environmental impact- the first nine years 1996-2004. AgBioForum 8: 187-196.
- Brookes G & Barfoot P (2006) GM crops: the first ten years – global socio-economic and environmental impacts. ISAAA Briefs. <http://www.isaaa.org>. 116 s.
- Brooks DR, Bohan DA, Champion GT, Houghton AJ, Hawes C, Heard MS, Clark SJ, Dewar AM, Firbank LG, Perry JN, Rothery P, Scott RJ, Woivod IP, Birchall C, Skellern MP, Walker JH, Baker P, Bell D, Browne EL, Dewar AJG, Fairfax CM, Garner BH, Haylock LA, Horne SL, Hulmes SE, Mason NS, Norton LR, Nuttall P, Randle Z, Rossall MJ, Sands RJN, Singer EJ & Walker MJ (2003) Invertebrate responses to the management of genetically modified herbicide-tolerant and conventional spring crops. I Soil-surface-active invertebrates. Phil Trans Royal Soc Lond Series B- Biolog Sci 358: 1847-1862.
- Clark BW & Coats JR (2006) Subacute effects of CryIAb Bt corn litter on the earthworm *Eisenia fetida* and the springtail *Folsomia candida*. Environmental Entomology 35: 1121-1129.
- Collonnier C, Schattner A, Berthier G, Boyer F, Coue-Philippe G, Diolez A, Duplan M-N, Fernandez S & Kebdani N (2005) Characterization and event specific-detection by quantitative Real-Time PCR of 1507x59122 Maize insert. J AOAC Int. 88:536-546.
- Cortet J, Andersen MN, Caul S, Griffiths B, Joffre R, Lacroix B, Sausse C, Thomson J & Krogh PH (2006). Decomposition processes under *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) maize: Results of a multi-site experiment. Soil Biology & Biochemistry 38: 195-199.
- Cortet J, Griffiths BS, Bohanec M, Demsard D, Andersen MN, Caulc A, Birch NE, Pernin C, Tabone E, Vaufloury A, de Keh X. & Krogh PH (2007), Evaluation of effects of transgenic Bt maize on microarthropods in a European multi-site experiment. Pedobiologia 51:207-218.
- de Maagd RA, Bravo A, Berry C, Crickmore N & Schnepf HE (2003) Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. An Rev Genet 37: 409-433.

- de Vries J & Wackernagel W. (2002) Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* ;99(4):2094-2099.
- DEFRA (2006) New Bt toxins in the EU GMO application process: A review of published research into impacts on non-target insects and ecosystem services. Report from the UK Department for Environmental, Food and Rural Affairs. 53 s.
- Douville M, Gagne F, Masson L, McKay, J & Blaise C (2005) Tracking the source of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab endotoksin in the environment. *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 219-232.
- Douville M, Gagne F, Blaise C & André, C (2007) Occurrence and persistence of *Bacillus thuringiensis* Bt corn *cry1Ab* gene from an aquatic environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66: 195-203.
- Devos Y, Reheul D & De Schrijver A (2005) The co-existence between transgenic and non-transgenic maize in the European Union: a focus on pollen flow and cross-fertilization. *Environ. Biosafety Res.* 4:71-87.
- Eastham K & Sweet J (2002) Genetically modified organisms (GMO): The significance of gene flow through pollen transfer. Environmental issue report. No 28. European Environment Agency (EEA), Copenhagen. http://reports.eea.eu.int/environmental_issue_report_2002_28/en
- Eckes P (1994) Transcription of the bacterial Ampicillin resistance gene in Glyphosate tolerant maize lines T14 and 1507x59122. Report/Study AgrEvo No Ec94.01. 5p.
- Eckes P, Vijtewaal B & Donn G (1989) Synthetic gene confers resistance to the broad spectrum herbicide L-phosphinothricin in plants. *J Cellular Biochem Suppl.* 13D:334.
- 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) Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glufosinate. Summary of the EFSA Scientific Report (2005) 27: 1-81. 5 s.
- EFSA (2006) Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. 100 s. http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_guidance/660.html
- Emberlin J, Adams-Groom B & Tidmarsh J (1999) The dispersal of maize (*Zea mais*) pollen. A report commissioned by the Soil Association: A National Pollen Research Unit, University College Worcester, UK.
- EPA (2001) Pest Fact Sheet: *Bacillus thuringiensis* subspecies Cry1F Protein and the Genetic Material Necessary for its Production (Plasmid Insert PHI 8999) in (004681), pp.28. United States Environmental Protection Agency. http://www.epa.gov/opp00001/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_006481.htm
- Escher N, Käch B & Nentwig W (2000) Decomposition of transgenic *Bacillus thuringiensis* maize by microorganisms and woodlice *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *Basic and Applied Ecology* 1: 161–169.

- Flores S, Saxena D & Stotzky G (2005) Transgenic *Bt*-plants decompose less in soil than non-*Bt* plants. *Soil Biology & Biochemistry* 37:1073-1082.
- Glare TR & O'Callaghan (2000) *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety. Wiley and Sons, Chichester. 350 p.
- Griffiths BS, Caul S, Thompson J, Birch N, Scrimgeour C, Andersen MN, Cortet J, Messéan A, Sausse C, Lacroix B & Krogh PH (2005) Microbial community structure, protozoa and nematodes in soil from field plots of genetically modified maize expressing the *Bacillus thuringiensis* toxin. *Plant and Soil* 275:135-146.
- Griffiths BS, Caul S, Thompson J, Birch, Cortet J, Andersen MN & Krogh PH (2007) Microbial and microfaunal community structure in cropping systems with genetically modified plants. *Pedobiologia* 51: 195-206.
- Hallauer AR (2000) Potential for outcrossing and weediness of genetically modified insect protected corn. APHIS-USDA.
- Halsey ME, Remund KM, Davis CA, Qualls M, Eppard PJ & Berberich S (2005) Isolation of Maize from Pollen-Mediated gene Flow by Time and Distance *Crop Science* 45: 2172-2185.
- Hanley AV, Huang ZY & Pett WL (2003) Effects of dietary transgenic Bt corn pollen on larvae of *Apis mellifera* and *Galleria mellonella*. *J Apic Res* 42: 77-81.
- Haughton AJ, Champion GT, Hawes C, Heard MS, Brooks DR, Bohan DA, Clark SJ, Dewar AM, Firbank LG, Osborne JL, Perry JN, Rothery P, Roy DB, Scott RJ, Woiwod IP, Birchall C, Skellern MP, Walker JH, Baker P, Browne EL, Dewar AJG, Garner BH, Haylock LA, Horne SL, Mason NS, Sands RJN & Walker MJ (2003) Invertebrate response to the management of genetically modified herbicide-tolerant and conventional spring crops II. Within-field epigeal and areal arthropods. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences* 358: 1899-1913
- Hawes C, Haughton AJ, Osborne JL, Roy DB et al. (2003) Responses of plants and invertebrate trophic groups to contrasting herbicide regimes in the Farm Scale Evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences* 358: 1863-1877.
- Heard MS, Hawes C, Champion GT, Clark SJ, Firbank LG, Haughton AJ, Parish AM, Perry JN, Rothery, P, Scott RJ, Skellern MP, Squire GR & Hill MO (2003) Weeds in fields with contrasting conventional and genetically modified herbicide-tolerant crops. I. Effects on abundance and diversity. *Phil Trans R Soc Land* 358: 1819-1832.
- Heard MS, Rothery P, Perry JN & Firbank LG (2005) Predicting longer-term changes in weed populations under GMHT crop management. *Weed Research* 45:331-338.
- Heckmann LH, Griffiths BS, Caul S, Thompson J, Pusztai-Carey M, Moar WJ, Andersen MN & Krogh PH (2006) Consequences for *Protaphorura armata* (Collembola : Onychiuridae) following exposure to genetically modified *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize and non-Bt maize. *Environmental Pollution* 142:212-216.
- Herman RA, Evans SL, Shanahan DM, Mihaliak CA, Bormett GA, Yound DL & Buehrer J (2001) Rapid degradation of Cry1F delta-endotoxin in soil. *Environm Entomol* 30: 642-644.

- Herman RA, Scherer PN & Wolt JD (2002a) Rapid degradation of binary, PS 149B1, delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in soil, and a novel mathematical model for fitting curve-linear decay. *Environ Entomol* 31: 208-214.
- Herman RA, Wolt JD & Halliday WR (2002b) Rapid degradation of the Cry1F insecticidal crystal protein in soil. *J Agr Food Chem* 50: 7076-7078.
- Herrero S, Borja M & Ferré J (2002) Extent of variation of the *Bacillus thuringiensis* toxin reservoir: the case of the Geranium Bronze, *Cacyreus marshalli* Butler (Lepidoptera: Lycaenidae). *Appl Environ Micro* 68: 4090-4094.
- Holland JM (2004) The environmental consequences of adopting conservation tillage in Europe: reviewing the evidence. *Agric Ecosyst Environ* 103: 1-25.
- Hopkins DW & Gregorich EG (2003) Detection and decay of the Bt endotoxin in soil from a field trial with genetically modified maize. *European Journal of Soil Science* 54:793-800.
- Ingram J (2000) Report on the separation distances required to ensure cross-pollination is below specific limits in non-seed crops of sugar beet, maize and oilseed rape. MAFF Project No RG0123
- Jung HG & Sheaffer CC (2004) Influence of Bt Transgenes on Cell Wall Lignification and Digestibility of Maize Stover for Silage. *Crop Science* 44: 1781-1789.
- Koskella J & Stozky G (2002) Larvicidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subspp, *kurstaki*, *morrisoni* (strain tenebrionis), and *israelensis* have no microbicidal or microbiostatic activity against selected bacteria, fungi, and algae in vitro. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 262-267.
- Kålås JA, Viken Å & Bakken T (eds.) (2006) Norsk Rødliste 2006 - 2006 Norwegian Red List. Artsdatabanken, Trondheim, Norway. 416 pp.
- Krogh PH, Griffiths B, Demsar D, Bohanec M, Debeljak M, Andersen MA, Sausse C, Birch ANE, Caul, S, Holmstrup M, Heckmann LH & Cortet J (2007) Responses by earthworms to reduced tillage in herbicide tolerant maize and *Bt* maize cropping systems. *Pedobiologia* 51: 219-227.
- Li HR, Oppert B, Higgins RA, Huang FN, Buschman LL. & Zhu KY (2005) Susceptibility of Dipel-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera : Crambidae) to individual *Bacillus thuringiensis* protoxins. *Journal of Economic Entomology* 98:1333-1340.
- Lid J & Lid DT (2005) Norsk flora. Det Norske Samlaget, Oslo. 7. utgave. 1230s.
- Malone LA & Pham-Delégue MH (2001) Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* sp.). *Apidologie* 32: 1-18.
- Pokelsek, J.D., Rosi-Marshall, E.J., Chambers, C.P., Griffiths, N.A., Evans-White, M.A, Tank, J.L., Whiles, M.R. & Royer, T.V (2007) Effects of Bt corn pollen on caddisfly growth rates in Midwestern agricultural streams. Abstract presented at the NABS Annual meeting, Columbia, South Carolina 2007.
<http://www.benthos.org/database/allnabstracts.cfm/db/Columbia2007abstracts/id/370>
- Netherwood T, Martín-Orúe SM, O'Donnell AG, Gockling S, Graham J, Mathers JC & Gilbert HJ. (2004) Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nat Biotechnol* 22(2):204-209.

- Nielsen KM., van Elsas JD & Smalla K (2000). Transformation of *Acinetobacter* sp. 13(pFG4delta*nptII*) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Appl Environ Microbiol* 66: 1237-42.
- Nielsen KM (2003) An assessment of factors affecting the likelihood of horizontal transfer of recombinant plant DNA to bacterial recipients in the soil and rhizosphere. Collection of Biosafety Reviews (Italy), Vol. 1. pp. 96-149.
- OECD (2003) Consensus Document on the biology of *Zea mays* subsp. *Mays* (Maize). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology (ENV/JM/MONO) No. 27:1-49.
- OECD (2007) Consensus Document on Safety Information on Transgenic Plants Expressing *Bacillus thuringiensis* – Derived Insect Control Proteins. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology (ENV/JM/MONO) No. 14:1-109.
- Perry JN, Firbank LG, Champion GT, Clark, SJ, Heard MS, May MJ, Hawes, C, Squire GR, Rothery P, Wolwod IP & Pidgeon JD (2004) Ban on triazin herbicides likely to reduce but not negate relative benefits of GMHT maize cropping. *Nature* 428: 313-316.
- Phipps RH & Park JR (2002) Environmental benefits of genetically modified crops: Global and European perspectives on their ability to reduce pesticide use. *Journal of Animal and Feed Science* 11: 1-18.
- Pietrzak M, Shillito DS, Hohn T & Potrykus I (1986) Expression in plants of two bacterial antibiotic resistance genes after protoplast transformation with a new plant expression vector. *Nucleic Acid Research* 14:5857-5868.
- Rognli OA (1994) Økologisk risiko ved utsetting av genmodifiserte kulturplanter. *Faginfo* nr. 2 21: 81-197.
- Rosie-Marshall, EJ, Tank, JL, Royer, TV, Whiles, MR, Evans-Whie, M., Chambers, C., Griffiths, NA, Pokelsek, J & Stephen, ML (2007) Toxins in transgenic crop byproducts may affect headwater stream ecosystems. *PNAS* 104: 16204-16208.
- Roy DB, Bohan, DA, Houghton AJ, Hill MO, Osborne JL, Clark SJ, Perry JN, Rothery P, Scott, RJ, Brooks DR, Champion, GT, Hawes C, Heard MS & Firbank LG (2003). Invertebrates and vegetation of field margins adjacent to crops subjected to contastion herbicide regimes in the Farm Scale Evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. *Phil Trans R Soc Lond B* 358: 1879-1898.
- Sanvido O, Stark M. & Bigler F (2006) Ecological impacts of genetically modified crops. Experiences from ten years of experimental field research and commercial cultivation. *ART-Schriftenreihe* 1. 1-84.
- Sanvido O, Widmer F, Winzeler M, Streit B, Szerencsits E & Biger F (2007) Definition and feasibility of isolation distances for transgenic maize cultivation. *TransgenicRes*. Online 12. juni 07. <http://www.springerlink.com/content/n561562061873351/>
- Saxena D & Stotzky G (2001) *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 33:1225–1230.

- Saxena D, Flores S & Stotzky G (2002) Bt toxin is released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events. *Soil Biology and Biochemistry*, 34:133–137
- Schubbert GW, Lettmann C & Doerfler W (1994) Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice *Mol Gen Genet* 242:495-504.
- Schütt G Stachaw U. & Werner A (2004). Agronomic and environmental aspects of the cultivation of transgenic herbicide resistant plants. ISSN 0722-186x. 115 s.
- Shelton AM, Zhao JZ & Roush RT (2002) Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annual Review of Entomology* 47: 845-881.
- Sims SR & Martin JW (1997) Effects of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins Cry1A(b), Cry1A(c), CryIIA and CryIIIA on *Folsomia candida* and *Xenylla grisea* (Insecta: Collembola). *Pedobiologia* 41:412–416
- Storer N, Babcock JM & Edwards JM (2006) Field measures of western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) mortality caused by Cry34/35Ab1 proteins expressed in maize event 59122 and implications for trait durability. *Journal of Economic Entomology* 99: 1381-1387.
- Tabashnik BE, Cushing NL, Finson N & Johnson MW (1990) Field Development of Resistance to *Bacillus-Thuringiensis* in Diamondback Moth (Lepidoptera, Plutellidae). *Journal of Economic Entomology* 83:1671-1676.
- Tabaschnik BE, Gassmann A, Crowder DW & Carrière Y (2008) Insect resistance to *Bt* crops: evidence versus theory. *Nature Biotechnology* 26: 199-208.
- Vercesi ML, Krogh PH & Holmstrup M (2006) Can *Bacillus thuringiensis* (Bt) corn residues and Bt-corn plants affect life-history traits in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*? *Applied Soil Ecology* 32:180-187.
- Vettori C, Paffetti D, Saxena D, Stotzky G & Giannini R (2003) Persistence of toxins and cells of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* introduced in sprays to Sardinia soils. *Soil Biology and Biochemistry* 35:1635-1642.
- VKM (2004) Vurdering av genmodifisert insekts- og herbicidtolerant mais (C/ES/01/01) til bruk som fôrvare.
- VKM (2005a) Report from an *Ad Hoc* Group appointed by the Norwegian Scientific Panel on Genetically Modified Organisms and Panel on Biological Hazards – An assessment on potentially long-term health effects caused by antibiotic resistance marker genes in genetically modified organisms based on antibiotic usage and resistance patterns in Norway. 62 s.
- VKM (2005b) Uttalelse om Pioneer Hi-Breds/Mycogen Seeds genmodifiserte mais 59122 (EFSA/GMO/NL/2005/12) (05/324).
- VKM (2006) Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer. Vurdering av foreslåtte virkemidler for sameksistens mellom genmodifiserte vekster og konvensjonelt/økologisk landbruk, og rangering av spredningsrisiko av transgener fra relevante genmodifiserte.
- VKM (2007) Uttalelse om Pioneer Hi-Bred/Mycogen Seeds genmodifiserte mais 1507x59122 (EFSA/GMO/NL/2005/15) (07/316).

Wolt J, Conlan C & Majima K (2005) An ecological risk assessment of Cry1F maize pollen impact to pale grass blue butterfly. *Environ Biosafety Res* 4: 243-251.

Zwahlen C, Hilbeck A, Gugerli P & Nentwig W (2003a) Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field. *Molecular Ecology* 12:765-775.

Zwahlen C, Hilbeck A, Howald R, Nentwig W (2003b) Effects of transgenic Bt corn litter on the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Molecular Ecology* 12:1077-1086.

VEDLEGG

Tabell 1. Sammendrag over godkjenninger av maishybrid 1507x59122

Land	Utsetting	Mat og/eller fôr	Mat	Fôr
Japan	2006		2005	2006
Korea			2006	
Mexico		2006		

Kilde: Agbios (2008)

Tabell 2. Sammendrag over godkjenninger av maislinje 1507

Land	Utsetting	Mat og/eller fôr	Mat	Fôr
Argentina	2005	2005		
Australia			2003	
Canada	2002		2002	2002
Kina		2004		
Japan	2002		2002	2002
Korea			2002	2004
Mexico		2003		
Filippinene			2003	2003
Sør-Afrika		2002		
Taiwan			2003	
USA	2001	2001		

Kilde: Agbios (2008)

Tabell 3. Sammendrag over godkjenninger av maislinje 59122

Land	Utsetting	Mat og/eller fôr	Mat	Fôr
Australia			2005	
Canada	2005		2005	2005
Japan	2006		2006	2006
Korea			2005	2005
Mexico		2004		
Filippinene			2006	2006
USA	2005	2004		

Kilde: Agbios (2008)